

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg - Essen

Aus der Klinik für
Neurologie

**Reduktion des Blutungsrisikos in der rt-PA Therapie durch
Blockade des Annexin II Rezeptors mit Lipoprotein(a) beim
experimentellen Schlaganfall an Mäusen**

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg–Essen

Vorgelegt von
Alexander Malin
aus Berlin
2005

Dekan : Univ.–Prof. : Dr. rer. nat. K.-H. Jöckel

1. Gutachter : Priv. – Doz. Dr. med. E. Busch

2. Gutachter : Univ.–Prof. : Dr. rer. nat. F. U. Schade

Tag der mündlichen Prüfung : 24. Oktober 2005

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	3
1 Einleitung	6
1.1 Thrombolytische Therapie beim ischämischen Hirninfarkt.....	6
1.2 Epidemiologie	7
1.3 Einführung	8
1.4 Lipoprotein(a) als Risikofaktor	8
1.5 Der Annexin II Rezeptor und Lp(a)	9
1.6 Ziel der Studie.....	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Tierstamm.....	12
2.2 Vorversuche.....	12
2.3 Das thromboembolische Schlaganfallmodell	13
2.3.1 Anästhesie und Präparation der Femoralgefäße.....	13
2.3.2 Präparation der autologen Thromben (Clots)	13
2.3.3 Präparation der Halsgefäße	14
2.3.4 Embolisation.....	15
2.3.5 Gehirnperfusion und Entnahme	15
2.4 Durchführung der Experimente.....	16
2.5 Infarktgrößen	17
2.6 Lipoprotein (a) Präparation	17
2.6.1 Reinigung der Lp(a) Präparation mit Sephadex Pharmacia PD-10 Säule	18
2.6.2 Bestimmung der Lp(a) Konzentration an Mäusen	18
2.7 Immunhistochemie.....	18
2.7.1 Durchführung der Immunhistochemie	19
2.8 Silberfärbung	19
2.9 HE-Färbung	20

2.10	Lösungen	20
2.11	Mikroskopische Auswertung	20
2.11.1	HE-Färbungen und intrazerebrale Blutungen	20
2.11.2	Immunhistochemische Auswertung	21
2.11.3	Auswertung der PAP-Färbung	21
2.12	Statistik	22
3	Ergebnisse	23
3.1	Physiologie	23
3.2	HE-Färbung und intrazerebrale Blutungen	23
3.3	Silberfärbung und Infarktgrößen	25
3.4	PAP-Färbung und BHS-Störungen	25
3.5	Immunhistochemie	27
3.5.1	t-PA Färbung	27
3.5.2	PAI Färbung	28
3.5.3	Annexin II Färbung	28
4	Diskussion	30
4.1	Methodische Aspekte	30
4.2	Mikroskopische Auswertung	31
4.3	Interaktionen von Lp(a) und Annexin II an Endothelzellen und Auswirkungen auf Aktivatoren / Inhibitoren der Fibrinolyse	31
4.3.1	Lipoprotein(a) und Plasminogen	31
4.3.2	Effekte von Lp(a) auf PAI und t-PA	33
4.3.3	Interaktionen am Annexin II Rezeptor	33
4.4	Einordnung der Ergebnisse in den theoretischen Hintergrund	35
4.4.1	Immunhistochemie	35
4.4.2	BHS-Störungen	37
4.4.3	Lipoprotein(a)-klinische Anwendung	37
4.4.4	Weitere Ansätze zur Blutungsreduktion	38
5	Zusammenfassung	39
	Literaturverzeichnis	40
	Abbildungsverzeichnis	46

Abbildungsanhang	47
Protokolle der Immunhistochemie	52
Abkürzungsverzeichnis	57
Danksagung.....	59
Lebenslauf	60

1 Einleitung

1.1 *Thrombolytische Therapie beim ischämischen Hirninfarkt*

Beim ischämischen Schlaganfall (ca. 80% aller Schlaganfälle) sterben im Infarktkern Neuronen innerhalb von wenigen Minuten ab. Das Gebiet um den Kern herum, die ischämische Penumbra, besteht aus funktionell geschädigten Zellen, die aber über Kollateralgefäße noch mit Sauerstoff und Glukose versorgt werden. Diese Zellen sind strukturell noch intakt, können aber sekundär in das Infarktgeschehen mit einbezogen werden. Bei der thrombolytischen Therapie mit recombinant-tissue-type Plasminogen Activator (rt-PA) beim akuten ischämischen Schlaganfall wird durch eine schnelle Rekanalisierung des verschlossenen Gefäßes die Prognose des Patienten verbessert.

In den letzten Jahren wurden einige Studien zur Thrombolysetherapie mit rt-PA durchgeführt. In der NINDS-Studie (National Institute for Neurological Disorders and rt-PA Stroke Study Group) mit einem Zeitfenster von 3 Stunden (Auftreten der Symptome bis Behandlungsbeginn) ergab sich eine signifikante Verminderung der Behinderungen und eine nichtsignifikante Verminderung der Mortalität der Patienten. Bei 6% der mit rt-PA behandelten Patienten trat eine intrazerebrale Blutung auf. Hier wurde die Hälfte der Patienten innerhalb von 90 min. und die andere Hälfte innerhalb von 180 min. nach Symptombeginn behandelt. (National Institute for Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995,1997).

In ECASS I und II (European Cooperative Acute Stroke Study, Hacke et al. 1995, 1998) mit Zeitfenstern bis zu 6 Stunden ergaben sich nichtsignifikante Trends, daß mehr Patienten behinderungsfrei überlebten. In der ATLANTIS-Studie (Clark et al., 1999) ergab sich kein Unterschied zwischen Behandlung und Placebo in den Stunden 4 und 5. Die Behandlung mit 0,9 mg/kgKG rt-PA reduzierte die Mortalität nicht. (NINDS und ECASS II)

In der Analyse der gepoolten Daten aus diesen Studien im Jahr 2004 (The ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA Study Group Investigators, 2004)

wurde neben den schon erwähnten Ergebnissen nochmals die signifikante Erhöhung der intrakraniellen Blutungen hervorgehoben (5,9% bei behandelten Patienten und 1,1% bei der Placebo Gruppe). Dies stellt eine schwere Komplikation der rt-PA Therapie dar.

Die Therapie beim akuten ischämischen Hirninfarkt mit einer Dosierung von 0,9 mg/KgKG rt-PA, begonnen innerhalb von 3 Stunden nach Symptombeginn, ist effektiv und in Deutschland zugelassen. Voraussetzung ist aber, daß die Indikationen und Kontraindikationen wie in der NINDS Studie angewendet werden. Dies führt dazu, daß viele Patienten von der Therapie ausgeschlossen werden und somit nicht die optimale Versorgung erhalten. Eine Optimierung der Therapie ist daher notwendig. Die Reduzierung der Frequenz und der Intensität intrakranieller Blutungen ist besonders anzustreben, um die Therapie sicherer durchzuführen und mehr Patienten behandeln zu können.

1.2 Epidemiologie

Der Schlaganfall ist, nach Krebserkrankungen und kardiovaskulären Erkrankungen, die dritthäufigste Todesursache in Industrienationen. In Europa liegt die jährliche Mortalität zwischen 63,5 und 174,3/100.000 Einwohnern. Die Inzidenz in Europa ist in den einzelnen Ländern unterschiedlich und wird mit 100 bis 200 Neuerkrankungen pro Jahr und 100.000 Einwohnern angegeben. (EUSI, European Stroke Initiative, 2003).

Demnach stellt der Schlaganfall eine enorme ökonomische Belastung für die Gesundheitssysteme dar.

1.3 Einführung

Die hier vorliegende Arbeit untersucht einen möglichen Ansatz, die Frequenz und Intensität der intrazerebralen Blutungen zu reduzieren. Lipoprotein(a) könnte hier einen positiven Einfluß auf die Reduktion der Blutungen besitzen. Durch seine physiologisch eher ungünstigen antiplasminogenen Eigenschaften, die im Folgenden näher erläutert werden, könnte eine selektive Beeinflussung der endothelialen Plasmingeneration durch Blockade des Annexin II Rezeptors denkbar sein und so eine Reduktion der Blutungen erfolgen.

1.4 Lipoprotein(a) als Risikofaktor

Lipoprotein (a) wird in der Leber synthetisiert und besteht aus einem Low-Density-Lipoproteinpartikel (LDL) sowie dem Apolipoprotein (a), welches über eine Disulfidbrücke an das Apolipoprotein B 100 des LDL-Partikels gebunden ist (de la Pena –Diaz et al., 2000), wobei Apo(a) die entscheidende Differenz zwischen Lp(a) und LDL darstellt (Angles–Cano et al., 1997). Die physiologische Funktion von Lp(a) und sein Metabolismus sind weitgehend unbekannt (Hansen et al., 1993; Macrovinia et al 1998).

Lp(a) weist jedoch eine ungünstige atherogene und antiplasminogene Wirkung auf, die durch die strukturelle Ähnlichkeit des Apolipoprotein(a) mit Plasminogen erklärt wird. Lp(a) konkurriert mit Plasminogen um dessen Bindungsstellen an vaskulären Endothelzellen, was die fibrinolytische Aktivität vermindert und Plaquibildung begünstigt. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Apo(a) und Lp(a) die Bindung von Plasminogen an Fibrin inhibieren (Rouy et al., 1992). Die antiplasminogene und atherogene Wirkung von isoliertem LDL auf Endothelzellen ist schwächer als die des Lipoprotein(a). Dies unterstreicht die entscheidende Rolle des Apo(a) bei der antiplasminogenen Wirkung (Angles–Cano et al., 2001).

Lipoprotein(a) erhöht zudem die Expression von Plasminogen–Aktivator–Inhibitor 1 (PAI) an vaskulären Endothelzellen und reduziert gleichzeitig die

t-PA Generation, was den atherogenen Wirkmechanismus von Lp(a) zusätzlich erklären könnte (Zhang et al., 2000).

Des Weiteren wurde Lp(a) auch als intakter Partikel in der arteriellen Intima gefunden, assoziiert mit atherosklerotischen Plaques. Lp(a) scheint das Endothel durchdringen zu können und dort seine atherogene Wirkung freizusetzen, indem sich residente Makrophagen in Schaumzellen transformieren (Scanu et al., 1991, 1992).

Lp(a) gilt als ein eigenständiger, unabhängiger Atherosklerose Risikofaktor und als potentieller Risikofaktor bei zerebro-kardiovaskulären Erkrankungen (Fujino et al., 2000; Miles et al., 1989). Die atherogenen Eigenschaften von Lp(a) kommen ab einer Serumkonzentration über 30 mg/dl zum Ausdruck (Romics et al., 1990).

1.5 Der Annexin II Rezeptor und Lp(a)

Eine mögliche Ursache für die antiplasminogene Wirkung von Lp(a) lässt sich bei Betrachtung der Interaktion am Annexin II Rezeptor finden. Annexin II ist ein calciumreguliertes, phospholipidbindendes Protein, welches als ein profibrinolytischer Rezeptor für t-PA und Plasminogen fungiert (Hajjar et al., 2000). Kinetische Analysen ergaben, daß gereinigtes Annexin II Monomer die t-PA abhängige Plasmingeneration um den Faktor 60 verstärkt (Cesarman et al., 1994). Diese katalytische Effizienz des Annexin II ist spezifisch für t-PA und Plasminogen (Zhang et al., 2002).

Die Bindungsstellen für Plasminogen und t-PA am Annexin II Rezeptor konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Plasminogen bindet an der core-Domäne von Annexin II während die t-PA Bindung an der tail-Domäne nachgewiesen wurde (Hajjar et al., 1998). Die Bindung von t-PA an der tail-Domäne kann durch Homocystein inhibiert werden (Hajjar et al., 1998).

Wenn Plasmin allerdings mit Annexin II inkubiert wird, führt dies zu einem Verlust der Plasminaktivität von bis zu 95%. Annexin II stimuliert hier eine

autoproteolytische Reaktion der leichten und schweren Ketten des Plasmins (Fitzpatrick et al., 2000).

Lp(a) konkurriert durch die Strukturhomologie des Apolipoprotein(a) mit Plasminogen um die Bindungsstelle am Annexin II Rezeptor und inhibiert dort die Bindung von Plasminogen. Lp(a) ist in der Lage die endotheliale Plasminogen Aktivierung durch t-PA um 95% zu reduzieren (Hajjar et al., 1989, 1998, 1999). Dies könnte einen möglichen Mechanismus für die antiplasminogene und atherogene Wirkung von Lp(a) darstellen.

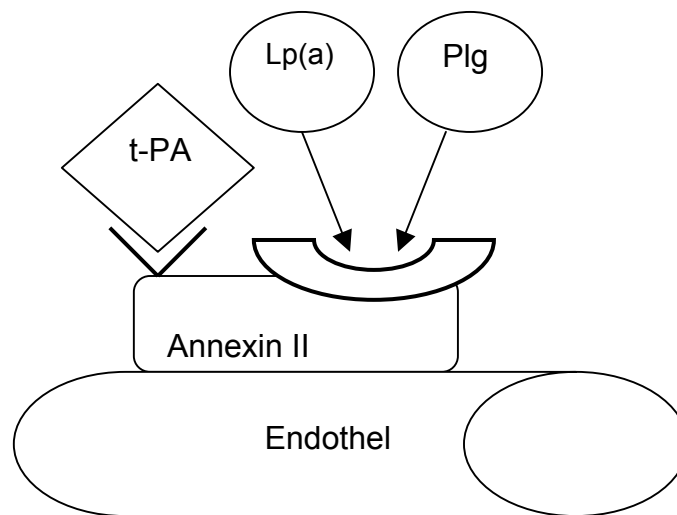


Abbildung 1 : Lp(a), Plasminogen (Plg) und t-PA: Bindung am Annexin II Rezeptor

Dieser Zusammenhang von Lp(a) und Annexin II ist die Grundlage der theoretischen Überlegungen zum Wirkmechanismus dieser Studie. Eine Beeinflussung der endothelialen Plasmingeneration durch Lp(a) könnte einen

positiven Effekt auf die Blutungsreduktion in der rt-PA Therapie haben. Gleichzeitig soll die fibrinolytische Aktivität am Gerinnsel erhalten bleiben.

1.6 Ziel der Studie

Diese Studie testet folgende Hypothesen :

1. Die Frequenz und Ausdehnung intrazerebraler Blutungen wird durch Applikation von Lipoprotein(a) reduziert
2. Die Infarktgröße wird durch Lipoprotein(a) nicht beeinflusst

Dies wurde an einem thromboembolischen Schlaganfallmodell mit anschließender thrombolytischer rt-PA Therapie bei Mäusen getestet. Zusätzlich wurden die histologischen Präparate immunhistochemisch untersucht und gefärbt (Silber, HE).

Die Immunhistochemie soll zu einem besseren Verständnis der Interaktionen von Lp(a) am Annexin II Rezeptor und dessen Lokalisation beitragen sowie zusätzliche Informationen über Komponenten des fibrinolytischen Systems (PAI, t-PA) und deren Verteilung im Gewebe nach einer Ischämie liefern. In der HE- und Silberfärbung wurden die Blutungen und die Infarktgrößen beurteilt. In der Peroxidase-antiperoxidase (PAP) Färbung wurden Störungen der Blut-Hirn-Schranke beurteilt und klassifiziert.

2 Material und Methoden

2.1 Tierstamm

Das Tierhandling und die Operationen wurden in Übereinstimmung mit § 8 Tierschutzgesetz durchgeführt und waren durch die lokalen Komitees genehmigt worden. Es wurden männliche NMRI Mäuse mit einem Gewicht von 40–60g verwendet. Die Tiere wurden im zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen in einem festgesetzten 12 Stunden Tag-Nacht Rhythmus gehalten. Die Tiere erhielten Futter und Wasser ad libidum. Die Luftfeuchtigkeit betrug $50 \pm 5\%$, die Raumtemperatur wurde konstant zwischen 20 und 22° C gehalten und ein 10facher Luftwechsel war gewährleistet.

2.2 Vorversuche

Vor Beginn der Experimente war eine Reihe von Vorversuchen nötig, um die Operationstechnik des thromboembolischen Schlaganfallmodells zu erlernen und mögliche Komplikationen während der Versuche zu erkennen und zu beheben. Hierzu waren Versuche mit ca. 40 Tieren über einen Zeitraum von etwa 6 Monaten notwendig, um die erforderliche Sicherheit während der Operation zu erlangen. Erst dann konnte die eigentliche Versuchsreihe gestartet werden.

Die Operation bis zur Embolisation der ACM konnte in einem Zeitraum von 2 Stunden sicher durchgeführt werden. So wurde eine Schwankung der Versuchsdauer vermieden. Techniken zur rektalen Messung der Körpertemperatur und des arteriellen Blutdruckes über die A. Femoralis wurden ebenfalls sicher durchgeführt.

2.3 *Das thromboembolische Schlaganfallmodell*

2.3.1 Anästhesie und Präparation der Femoralgefäße

Die Tiere wurden mit 1,5 Vol% Halothan anästhesiert und auf dem Rücken liegend auf einer Heizmatte fixiert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde das Halothan auf 0,6 Vol% bei Spontanatmung der Mäuse reduziert. Im Verlauf des Versuchs wurden die Tiere überwacht und das Halothan ggf. erhöht oder reduziert. Die Körperkerntemperatur wurde rektal alle 20 min. gemessen und im physiologischen Bereich gehalten. Alle chirurgischen Eingriffe wurden unter einem Operationsmikroskop (SM33Hund, Wetzlar, Deutschland) vorgenommen. Die rechte A. und V. femoralis wurden dargestellt und anschließend die Arterie mit einem PE-10 Katheter(Merck Eurolab, Bochum, Deutschland) kanüliert. Der arterielle Katheter diente zur kontinuierlichen Messung des mittleren arteriellen Blutdruckes (TC Elektronik BPM 87), zur Blutentnahme, zur Substitution von NaCl sowie der Applikation von Lp(a).

2.3.2 Präparation der autologen Thromben (Clots)

Aus der Arteria femoralis wurden 0,2 ml Blut entnommen und mit 0,04 ml bovinem Thrombin in einer Konzentration von 1mg/ml gemischt (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland). Das Blut-Thrombin-Gemisch wurde sofort in 3 vorbereitete PE-10 Katheter von je 30 cm Länge injiziert. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 45 min. wurden die Thromben aus den Kathetern gespült und in einem vorbereiteten NaCl/Phosphat Puffer (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) gewaschen, um die Erythrozyten zu entfernen. Anschließend wurden die Thromben in einen NaCl/Phosphat Puffer mit Albumin (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) überführt. So wurde eine Adhäsion mit dem Kathetermaterial verhindert. Unter dem Mikroskop wurden nun die fibrinreichen Segmente identifiziert und in ca. 1,5 mm lange Fragmente zerteilt. Anschließend wurden 4 fibrinreiche Thromben (Clots) in einen weiteren

PE-10 Katheter aufgezogen, so daß sie in einem Abstand von ca. 4cm zu liegen kamen.

2.3.3 Präparation der Halsgefäße

Für die Präparation der Halsgefäße wurde die Haut in der Halsmitte über eine Länge von ca. 2 cm inzidiert. Anschließend erfolgte die vorsichtige stumpfe Spaltung der trachealen Halsmuskulatur und Darstellung der Trachea.

Das Operationsfeld wurde leicht nach rechts verlagert und der rechte M. digastricus lateralis identifiziert. An dieser Leitstruktur entlang wurde mit der geforderten Sorgfalt in die Tiefe präpariert. Anschließend wurden die Arteria carotis communis (ACC), die Karotisbifurkation mit den Aa. carotis interna (ACI) und externa (ACE) dargestellt und präpariert. Hierbei wurden die nervalen Strukturen, vor allem der Nervus vagus, identifiziert und geschont. Die Arteria pterygopalatina wurde direkt nach ihrem Abgang aus der ACI mit einem Seidenfaden ligiert. Die Arteria thyreoidalis und die Arteria occipitalis, die aus der ACE entspringen, wurden koaguliert und die ACE dann distal mit einem Seidenfaden ligiert. Die ACC wurde mobilisiert und ein Seidenfaden vorgelegt um den Katheter zur Embolisation fixieren zu können. Dann wurden die ACC und die ACI temporär geklippt. Da die Maus über einen gut ausgebildeten Circulus arteriosus Willisii verfügt wird durch den einseitigen Carotisverschluß keine Ischämie des Gehirns verursacht.

Nun wurde die ACC eröffnet und ein mit 4 Clots bestückter PE-10 Katheter eingeführt. Der Katheter wurde vorsichtig über die Bifurkation hinweg bis in die ACI vorgeschoben und dann mit dem Seidenfaden fixiert. Der Clip über der ACI wurde entfernt und so der Blutfluss wieder freigegeben. Der Clip über der ACC wurde belassen. Abbildung 2 gibt einen schematischen Überblick des Operationssitus direkt vor der Embolisation.

2.3.4 Embolisation

Der mit den 4 fibrinreichen Clots bestückte PE-10 Katheter wurde in die ACC und über die Bifurkation hinweg bis in die ACI vorgeschoben. Die Clots wurden dann einer nach dem anderen über eine Zeitspanne von ca. 30 sec in die ACI injiziert. Nach der Embolisation wurde der Katheter weiter mit NaCl 1ml/h via Perfusor (Syramed μ SP6000, ACROMED, Giessen, Deutschland) gespült um eine spontane Thrombusbildung zu verhindern.

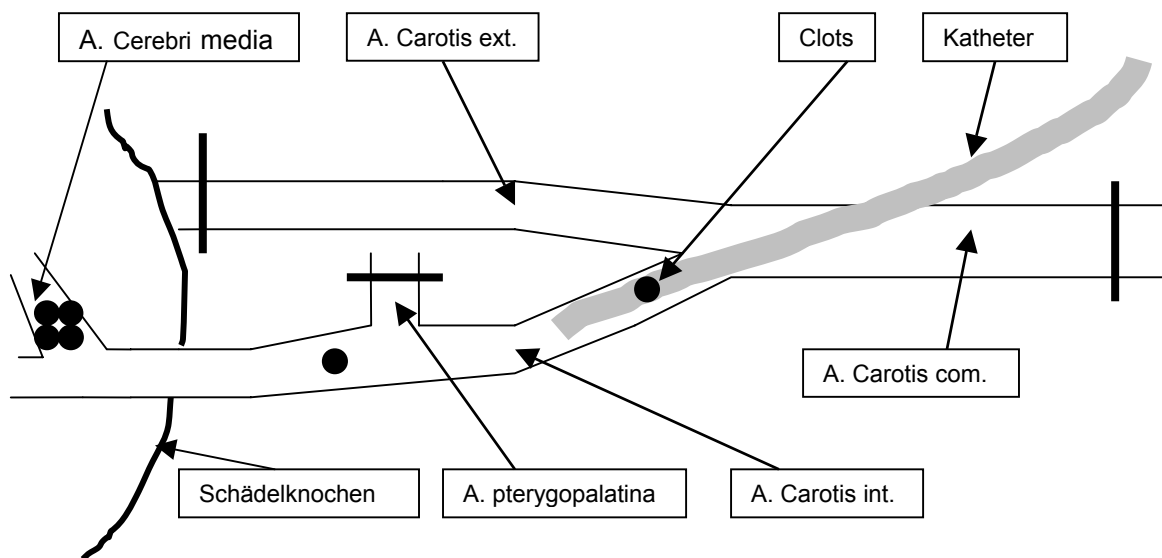


Abbildung 2: Operationssitus

2.3.5 Gehirnperfusion und Entnahme

Am Ende der Experimente wurden die Tiere noch einmal tief anästhesiert und anschließend der Thorax eröffnet und die Aorta descendens geklippt. Das Perikard wurde eröffnet und die Aorta ascendens präpariert. Anschließend wurde der linke Ventrikel am Apex eröffnet und eine stumpfe Kanüle in die Aorta ascendens eingeführt und proximal des rechten Truncus

brachiocephalicus fixiert. Der rechte Vorhof wurde eröffnet und das Gehirn mit einer Lösung aus Albumin, Heparin (Liquemin N 25.000 Roche) und Na-Nitroprussid (Nipruss, Schwarzpharma) perfundiert und entnommen.

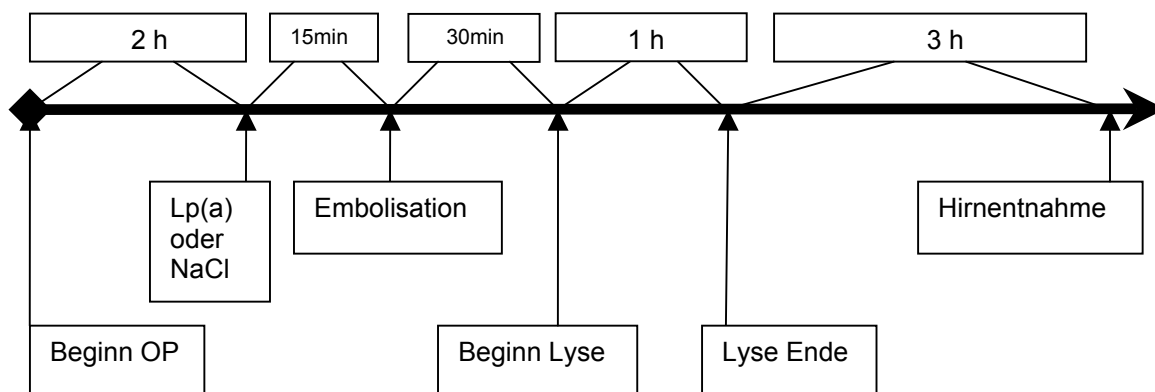
2.4 Durchführung der Experimente

Die Experimente wurden nach dem in der Arbeitsgruppe entwickelten Modell des thromboembolischen Schlaganfalles (Busch et al., 1997) durchgeführt.

Die Operationsdauer der Femoral- und Halsgefäße betrug ca. 2 Stunden. 15 min. vor der Embolisation erfolgte die Applikation von Lp(a) in der Versuchs- bzw. NaCl in der Placebogruppe. Nach der Embolisation und einer anschließenden Zeitspanne von 30 min. wurde die thrombolytische Therapie mit 1,0 mg rt-PA begonnen. 10%, also 0,1mg, wurden initial als Bolus verabreicht, 0,9 mg dann über 60 min.

Nach der Lysetherapie wurden die Tiere noch 3 Stunden überwacht und anschließend das Gehirn entnommen. Die Lagerung der Gehirne erfolgte nach Schockfrostung in flüssigem Stickstoff bei -80°C bis zur mikroskopischen Aufbereitung.

Der zeitliche Ablauf der Experimente ist in Abbildung 3 dargestellt.



2.5 Infarktgrößen

Bei allen Tieren wurde in der mikroskopischen Auswertung der Silber- und HE-Färbung ein Infarkt gesehen und ausgemessen. Die histologischen Schnitte wurden mit einem Scanner (Polaroid Sprint Scan 35) eingescannt und die Flächengröße der Infarkte am Computer mit Scion Image (NIH Public Domain Software) ausgemessen. Zunächst wurde das gesunde Gewebe der ischämischen Hemisphäre und anschließend die Größe der gesamten Hemisphäre bestimmt. Dann wurde die Größe des gesunden Gewebes von der Gesamtgröße subtrahiert und damit der Infarktbereich berechnet.

2.6 Lipoprotein (a) Präparation

Die Lp(a) Präparation wurde am Institut für Biochemie der Universität Graz, Österreich, nach einer dort entwickelten und etablierten Methode angefertigt (Kostner et al., 1999). In der Lp(a) Präparation sind 6,4 mg/ml Lp(a) in 50% Glycerol enthalten, zudem noch 0,5 mg/ml EDTA und 0,5 mg/ml Na-Azid. Letzteres ist toxisch und muss für in vivo Versuche entfernt werden. Dies geschah durch Reinigung der Präparation über eine Sephadex Pharmacia PD-10 Säule nach Anleitung des Institutes (s. 2.6.1). Die Berechnung der Lp(a) Menge, die bei den Versuchen appliziert wurde (Ziel: Verdopplung der Lp(a) Serumkonzentration), orientierte sich an den Laborwerten, die bei den Mäusen bestimmt wurden (s. 2.6.2). Bei einem aufgetragenen Volumen auf die Sephadex Säule von 0,2 ml entspricht dies 1,28 mg Lp(a) ($6,4 \text{ mg/ml} \cdot 0,2 \text{ ml}$). Da beim Reinigungsprozess über die Sephadex Säule jedoch ca. 20% Lp(a) verloren gehen, betrug die Lp(a) Menge nach dem Reinigungsverfahren 1,024 mg.

2.6.1 Reinigung der Lp(a) Präparation mit Sephadex Pharmacia PD-10 Säule

Zuerst wird die Säule mit 20 ml NaCl voreluuiert. Anschließend werden 0,2 ml der Lp(a) Präparation aufgetragen und in die Säule einsickern gelassen. Dann wird soviel NaCl aufgetragen daß das Gesamtvolumen inklusive Probe 2,8 ml beträgt, also 2,6 ml NaCl. Auch diese 2,6 ml lässt man in die Säule einsickern. Nun wird die Säule mit NaCl aufgefüllt und die 1,5fache Menge der ursprünglich aufgetragenen Probe von 0,2 ml aufgefangen (0,3ml). Diese 0,3 ml enthalten ca. 80% der aufgetragenen Lp(a) Konzentration.

2.6.2 Bestimmung der Lp(a) Konzentration an Mäusen

Blutentnahmen bei zwei Tieren und anschließende Bestimmung der Lp(a) Serumkonzentration nach den gängigen Standards des Zentrallabors der Universitätsklinik Essen ergaben Werte von 1,5 mg/dl und 3,3 mg/dl. Die Proben waren zum Zeitpunkt der Laborbestimmung hämolytisch und es wurde eine Methode zur Bestimmung bei Menschen angewandt.

2.7 Immunhistochemie

Das Grundprinzip der immunhistochemischen Nachweismethode beruht auf einer spezifischen Antigen–Antikörperreaktion. Hierbei wird das nachzuweisende Antigen (z. B. t–PA) mit einem spezifischen Primärantikörper inkubiert. Dieser bindet an das Antigen und es entsteht ein Antigen–Antikörperkomplex. Anschließend wird dieser Komplex mit einem Sekundärantikörper inkubiert, welcher an einen Peroxidasekomplex gebunden ist. Das Ergebnis wird sichtbar gemacht durch Anfärbung der Peroxidase.

2.7.1 Durchführung der Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen wurden jeweils an zwei aufeinander folgenden Tagen angefertigt. Am ersten Tag wurden die bei -80°C gelagerten Präparate aufbereitet, fixiert und gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem für das entsprechende Antigen (t-PA, PAI, Annexin II) spezifischen Primärantikörper. Die Inkubation erfolgte jeweils über Nacht bei 4°C im Kühlschrank.

Am zweiten Tag wurde dann der Antigen-Antikörperkomplex mit dem entsprechenden Sekundärantikörper bei 37°C für 30 min. inkubiert. Mit Wasserstoffperoxid wurden die endogenen Peroxidasen blockiert und dann eine exogene Peroxidase (Avidin-Biotin-Complex, ABC, Vectastain-Elite-Kit) hinzugefügt. Dann wurde der Komplex mit Chromogen (Vector Labs.) inkubiert. Die Hintergrundfärbung erfolgte mit Hämalunlösung (Mayer's, Diagnostica Merck). Die Färbungen für t-PA, PAI und Annexin II beruhen auf der immunhistochemischen ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex Methode) (Hsu et al., 1981). Die Peroxidase-Antiperoxidase Methode (PAP) mit unkonjugierten Antikörpern wurde zum Nachweis von Albumin angefertigt (Sternberger et al., 1970). Die jeweils benutzten Antikörper und Konzentrationsangaben sind in den angefügten Protokollen im Detail aufgeführt (s. S. 52ff.).

2.8 Silberfärbung

Für die Silberfärbung wurde zunächst eine Entwicklungslösung hergestellt. Dazu wurden 20 ml einer 37%igen Formaldehydlösung mit 70 ml Aqua dest. gemischt. Anschließend wurden 0,3 mg Hydrochinon und 15 ml Aceton hinzugefügt. Dies wird bei leichtem Schütteln aufgelöst. Dann werden 1,1g Trisodiumcitrat Dihydrat in der Lösung aufgelöst.

Für die zweite Lösung, die Imprägnationslösung, wurden zu 10 ml gesättigter Lithiumcarbonat Lösung 5 ml einer 10%igen Silbernitrat Lösung (0,5g AgNO₃ in Aqua dest.) hinzugefügt.

Anschließend wird Tropfen für Tropfen einer 25%ige –Ammonium Lösung hinzu gegeben, bis die Lösung klar wird.

Dann 75 ml Aqua dest. hinzufügen und die Lösung mit Alufolie abdecken und verdunkelt stehen lassen.

Färbevorgang :

Zunächst wurden die Präparate für 2 min. abgedunkelt in der Imprägnationslösung inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit Aqua dest. wurden die Objektträger dann 3 min. in der Entwicklungslösung inkubiert. Nach nochmaligem spülen in Aqua dest. und anschließendem trocknen wurden die Präparate mit Glycerin-Gelatine eingedeckelt.

2.9 HE-Färbung

2.10 Lösungen

- 1) PBS: Hergestellt in der Apotheke des Universitätsklinikums
- 2) PBS / BSA: 10 g Bovine Serum Albumin auf 200 ml PBS pH 7,4

2.11 Mikroskopische Auswertung

2.11.1 HE-Färbungen und intrazerebrale Blutungen

Die intrazerebralen Blutungen in der HE-Färbung wurden mikroskopisch untersucht und klassifiziert. Hier wurden folgende Kategorien unterschieden:

1. Keine Blutung
2. Leichte Blutung
3. Schwere Blutungen

Typische Beispiele zu den Kategorien der intrazerebralen Blutungen sind im Bildanhang dokumentiert (Abbildung 7).

2.11.2 Immunhistochemische Auswertung

Um die immunhistochemischen Präparate von t-PA, PAI und Annexin II auszuwerten, wurden in der Placebo und Lp(a) Gruppe sowohl die Anfärbung des Gewebes als auch die der Ventrikel und Gefäße mikroskopisch beurteilt. Die Anfärbungen von t-PA, PAI und Annexin II im gesunden Gewebe der ischämischen Hemisphäre, im Infarktbereich und in der kontralateralen gesunden Hemisphäre wurden miteinander verglichen. In Ventrikeln und Gefäßen wurden die Färbungen jeweils der ischämischen bzw. gesunden Hemisphäre beurteilt. Die beiden Gruppen Placebo/Lp(a) wurden sowohl untereinander als auch miteinander verglichen. So konnten klare Aussagen über Lokalisation und Unterschiede der untersuchten Proteine gemacht werden, ob z.B. t-PA im Infarktareal stärker vorhanden ist als im gesunden Gewebe oder ob es einen generellen Unterschied in der Verteilung der Proteine zwischen Infarktseite und Gegenseite oder zwischen den beiden untersuchten Gruppen gibt. Eine weitere Einteilung der Färbungen in verschiedene Intensitätsgrade wie bei den intrazerebralen Blutungen war nicht erforderlich und hätte die Aussagekraft der Ergebnisse nicht erhöht.

Die entsprechenden Areale in den Hemisphären wurden fotografiert und dokumentiert. Typische Beispiele sind im Bildanhang angeführt (Abbildungen 8, 9, 10, 11, 12).

2.11.3 Auswertung der PAP-Färbung

Die Blut-Hirn-Schranken(BHS)-Störungen sind in der PAP-Färbung durch den Nachweis von Albumin durch die Peroxidase-Anti-Peroxidase Reaktion nachgewiesen worden. Vor der Auswertung wurden die Präparate mit einem Durchlichtscanner an einem PC eingescannt und anschließend makroskopisch

und mikroskopisch beurteilt. Die Färbungen wurden in verschiedene Intensitätsgrade eingeteilt und in unterschiedlichen Hirnarealen untersucht. Dies waren die gesunde Hemisphäre, das gesunde Gewebe der ischämischen Hemisphäre und der Infarktkern. Die Einteilung der Intensität war wie folgt:

1. Keine BHS-Störungen erkennbar
2. Leichte BHS-Störung
3. Mittelschwere BHS-Störung
4. Schwere BHS-Störung

Nach dieser Klassifikation wurden die Ergebnisse dann sowohl innerhalb als auch zwischen den Gruppen Placebo und Lp(a) miteinander verglichen um Unterschiede zwischen den Intensitäten der BHS-Störungen und ihrer Lokalisation in den erwähnten Hirnarealen sowie zwischen den beiden Gruppen herauszuarbeiten. So konnten klare Aussagen über Effekte von Lp(a) auf die BHS dokumentiert werden. Beispiele für die BHS-Störungen in der PAP-Färbung sind im Bildanhang beigefügt (Abbildung 13).

2.12 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit Superior Performing Software Systems (SPSS) Version 11 für Windows angefertigt. Dabei wurden der Mittelwert, die Standardabweichung, der Standardfehler des Mittelwertes und der Student T-Test zur Berechnung der Signifikanzen benutzt (Physiologische Parameter, Infarktgrößen).

3 Ergebnisse

3.1 Physiologie

Alle Tiere wurden während des Versuches physiologisch überwacht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Blutdruck und Körpertemperatur wurden 20minütig gemessen. Alle Parameter befanden sich sowohl vor der Ischämie als auch in der folgenden Versuchsdauer im Normbereich. Signifikante Unterschiede in der Statistik ergaben sich nicht (Signifikanter Unterschied bei $p \leq 0,05$).

		vor Ischämie	Zeit nach Ischämie		
			1 Std.	2 Std.	3 Std.
art.Blutdruck (mm/Hg)	Placebo	103±6	100±6	105±10	81±4
	Lp(a)	96±12	95±8	100±3	88±3
Temperatur (°C)	Placebo	35,1±1	35,2±2	35,6±1	35,8±0,5
	Lp(a)	35,7±1	36,3±0,75	36,4±1	36,1±0,95

Tabelle 1: Physiologische Parameter vor und nach zerebraler Ischämie

3.2 HE-Färbung und intrazerebrale Blutungen

Die HE-Färbung wurde zur Darstellung von Blutungen und Infarktbereichen angefertigt. Es wurde unterschieden zwischen Tieren, bei denen keine Blutung festgestellt werden konnte, Tiere, die eine leichte bzw. einfache Blutung erlitten und Tieren, die schwere bzw. multiple Blutungsareale aufwiesen (Abbildung 7 des Anhanges).

In der Placebogruppe wiesen vier Tiere eine leichte und zwei Tiere eine schwere Blutung auf. Im Gegensatz dazu konnten in der Versuchsgruppe bei drei Tieren keine Blutung und bei vier Tieren eine leichte Blutung festgestellt werden. Schwere Blutungen gab es in der Versuchsgruppe nicht.

In der Placebogruppe konnten bei allen Tieren Blutungsareale in der HE - Färbung identifiziert werden. Diese lagen teilweise in der Infarktzone, teilweise aber auch kontralateral und/oder disseminiert vor.

In der Versuchsgruppe sind bei drei Tieren keine Blutungsareale gefunden worden. Starke, bzw. disseminierte Blutungen wie in der Placebogruppe traten nicht auf. Dies lässt darauf schließen, daß in der Versuchsgruppe die Häufigkeit aber auch die Intensität der Blutungen im Vergleich zur Placebogruppe geringer ausfiel (Abbildung 4).

Intrazerebrale Blutungen

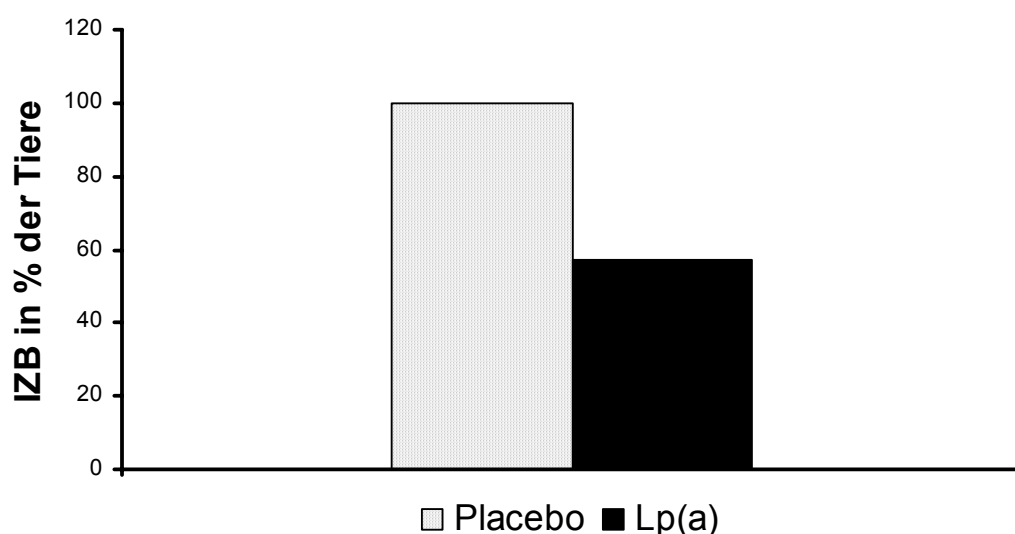


Abbildung 4 : Vergleich der Frequenz der intrazerebralen Blutungen Placebo (n=6) und Lipoprotein(a) (n=7) in Prozent

3.3 Silberfärbung und Infarktgrößen

Die Silberfärbung wurde angefertigt um die Infarkte mikroskopisch darzustellen und auszuwerten. Dabei zeigte sich bei allen Tieren ein Infarkt, wobei die Infarkte in der Versuchsgruppe ($39\% \pm 16\%$) im Vergleich zur Placebogruppe ($48\% \pm 15\%$) etwas kleiner ausfielen (Abbildung 5). Signifikante Unterschiede in der Statistik ergaben sich nicht ($p=0,223$).

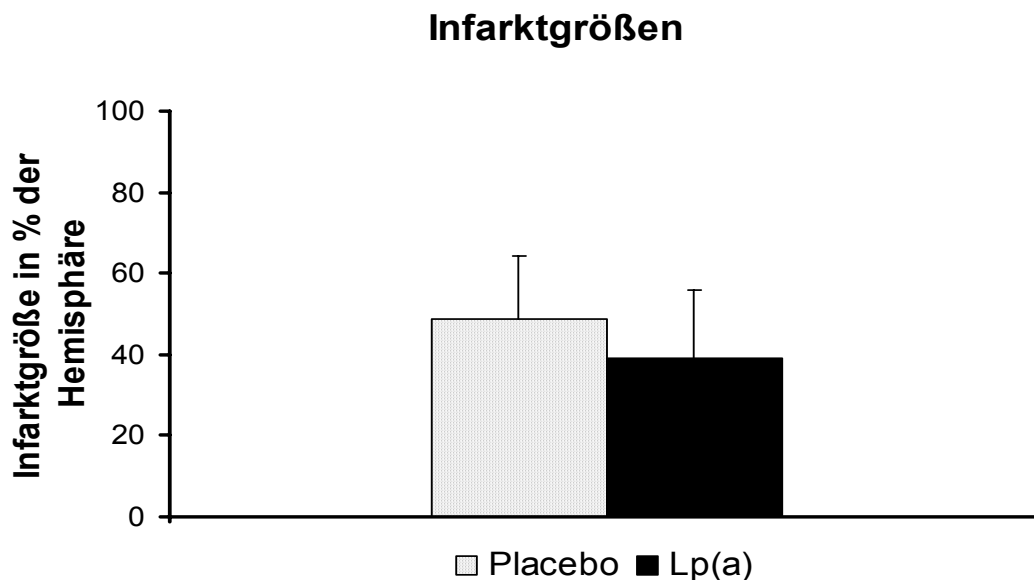


Abbildung 5 : Vergleich der Infarktgrößen Placebo (n=6) und Lipoprotein(a) (n=7) in Prozent der ischämischen Hemisphäre

3.4 PAP-Färbung und BHS-Störungen

Die PAP -Färbung wurde angefertigt um BHS –Störungen zu identifizieren und zu klassifizieren (Abbildung 6). Dabei wurde unterschieden zwischen Tieren die keine, leichte, mittlere oder schwere BHS –Störungen aufwiesen. Auch die Lokalisation der Störungen wurde berücksichtigt. Im Einzelnen wurden die

gesunde Hemisphäre, das gesunde Gewebe der ischämischen Hemisphäre und der Infarktbereich beurteilt.

Bei zwei Tieren aus der Lp(a) –Gruppe konnten nur Störungen im Infarktbereich gefunden werden, die übrigen untersuchten Areale waren nicht geschädigt. Die gesunde Hemisphäre wies bei fünf Tieren nur leichte Störungen auf und im gesunden Gewebe der ischämischen Hemisphäre waren bei vier Tieren leichte und bei nur einem Tier eine Schädigung mittleren Grades festzustellen. Eine schwere Störung wurde nur bei einem Tier im Infarktbereich gesehen.

In der Placebogruppe wiesen alle Tiere BHS –Störungen auf. Auch die Intensität war wesentlich stärker. Im gesunden Gewebe der ischämischen Hemisphäre wiesen alle Tiere Störungen leichten bis mittleren Grades auf, die gesunde Hemisphäre war nur bei einem Tier nicht geschädigt. Eine schwere Störung war auch hier bei einem Tier im Infarktbereich zu sehen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die BHS–Störungen in der Versuchsgruppe mit Lp(a) wesentlich geringer ausfielen als in der Placebogruppe. Ein positiver Effekt von Lp(a) auf die BHS–Störungen kann hier festgehalten werden.

Ein Beispiel für BHS–Störungen in der PAP–Färbung ist in Abbildung 13 des Anhanges dargestellt.

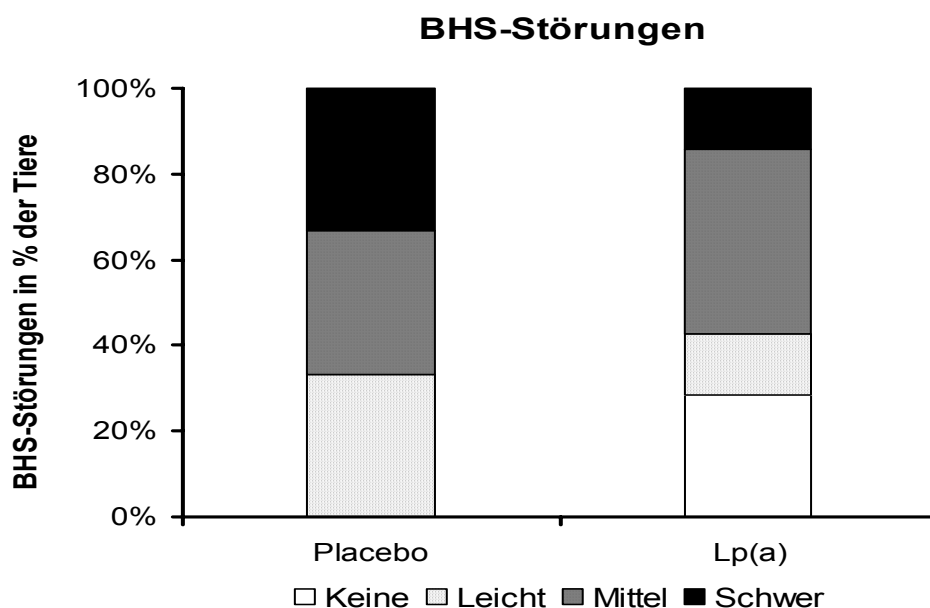


Abbildung 6: BHS-Störungen Placebo (n=6) und Lipoprotein(a) (n=7)

3.5 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen wurden zur Darstellung von t-PA (Abbildung 8,9 des Anhanges), PAI -1 (Abbildung 10 des Anhanges) und Annexin II (Abbildung 11 des Anhanges) angefertigt um Aufschluß zum Wirkmechanismus zu erhalten. Tabelle 2 gibt einen Überblick über den Nachweis der untersuchten Strukturen.

3.5.1 t-PA Färbung

In der t-PA Färbung wurde bei allen Tieren, unabhängig von Placebo –oder Versuchsgruppe, eine stärkere, flächenhafte Anfärbung im Infarktgewebe im Vergleich zum gesunden, nicht infarzierten Gewebe gesehen (Abbildung 8 des Anhanges). Dies lässt auf eine lokale Mehrproduktion von t-PA im Infarktbereich schließen. Ein Unterschied zwischen Placebo–und Versuchsgruppe war allerdings nicht zu erkennen.

T-PA färbte sich auch regelmäßig im Hippocampus an, ebenfalls unabhängig von Placebo–und Versuchsgruppe. Dies könnte ein Hinweis auf eine mögliche Produktion von t-PA durch hippocampale Zellen sein (Abbildung 9 des Anhanges).

Im Ventrikelendothel war t-PA ebenfalls regelmäßig nachweisbar. Hier war kein Unterschied in der Intensität zwischen Infarkt–oder kontralateraler Seite erkennbar. Gleiches gilt für die Anfärbung im Gefäßendothel.

Ein Unterschied in der Nachweisbarkeit oder Intensität der t-PA Färbung zwischen Placebo–und Versuchsgruppe im Bereich der Ventrikel oder der Gefäße war ebenfalls nicht festzustellen.

3.5.2 PAI Färbung

Die PAI -1 Immunhistochemie ergab im Gegensatz zur t-PA Färbung nur eine Anfärbung im Bereich des Ventrikel- und Gefäßendothels, nicht jedoch im Gewebe (Abbildung 10 des Anhanges).

Insgesamt fiel die Färbung schwächer und weniger intensiv aus als die t-PA Färbung der Ventrikel und Gefäße, was auf eine eventuelle negative Rückkopplung der PAI -1 Produktion durch t-PA und die Lysetherapie hinweisen könnte.

Unterschiede zwischen der Infarktseite oder der kontralateralen gesunden Seite konnten nicht festgestellt werden, ein Unterschied zwischen der Placebo- und Versuchsgruppe war nicht auszumachen.

3.5.3 Annexin II Färbung

Annexin II war, wie auch PAI -1, bis auf zwei Ausnahmen nur im Ventrikel –und Gefäßendothel nachweisbar (Abbildung 11 des Anhanges).

Bei zwei Tieren aus der Placebogruppe konnte eine stärkere, flächenhafte Anfärbung im Infarktbereich festgestellt werden (Abbildung 12 des Anhanges).

Annexin II färbte sich sonst regelmäßig im Bereich des Gefäß –und Ventrikelendothels an. Es war auch hier kein Unterschied in der Intensität der Färbung zwischen Placebo-und Versuchsgruppe festzustellen. Dies entspricht aber auch der Vermutung, daß Lp(a) an der Plasminogenbindungsstelle des Rezeptors bindet und somit die Verabreichung von Lp(a) keinen Einfluss auf die Nachweisbarkeit des Rezeptors in der Immunhistochemie hat, da Lp(a) den Antikörper nicht aus seiner Bindungsstelle am Rezeptor verdrängt.

Auch hier konnte kein Unterschied zwischen der betroffenen Infarktseite oder der kontralateralen Seite gefunden werden.

	T- Pa		PAI		Annexin II	
	<i>Placebo</i>	<i>Lp(a)</i>	<i>Placebo</i>	<i>Lp(a)</i>	<i>Placebo</i>	<i>Lp(a)</i>
Gefäß	4 /6	5/7	5 /6	6/7	4 /6	6/7
Ventrikel	6 /6	7/7	6 /6	7/7	6 /6	7/7
Hippocampus	3 /6	4/7	0 /6	0/7	0 /6	0/7
Infarktgebiet	6 /6	7/7	0 /6	1/7	2 /6	0/7

Tabelle 2: Überblick über den immunhistochemischen Nachweis von t-PA, PAI und Annexin II zwischen Placebo (n=6) und Lp(a) (n=7)

4 Diskussion

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, an einem thromboembolischen Schlaganfallmodell an Mäusen und anschließender thrombolytischer Therapie mit rt-PA, die Frequenz und die Intensität intrazerebraler Blutungen durch Applikation von Lp(a) zu reduzieren. Dies könnte einen therapeutischen Nutzen für die Therapie beim akuten, ischämischen Hirninfarkt haben, da das Risiko intrakranieller Blutungen reduziert und die Therapie somit optimiert werden könnte.

Die Einordnung in den theoretischen Hintergrund der Interaktionen von Lp(a) am Annexin II Rezeptor und die daraus abgeleiteten Überlegungen zum Wirkmechanismus der Blutungsreduktion wird durch die verschiedenen immunhistochemischen Färbungen und die daraus resultierenden Informationen beurteilt.

4.1 Methodische Aspekte

Bei der Durchführung der Operation, die zum thromboembolischen Schlaganfall führt, wurden die Tiere bei erhaltener Spontanatmung mit Halothan anästhesiert, was anfänglich im Rahmen der Vorversuche zu respiratorischen Problemen führte. Auf Grund des geringen Blutvolumens der Tiere war keine intraoperative Blutentnahme zur Blutgasanalyse oder Bestimmung von Gerinnungs- und Fibrinolyseparametern möglich. Zur physiologischen Überwachung wurden der intraarterielle Blutdruck und die Körpertemperatur verwendet.

Lipoprotein(a) konnte über Prof. Dr. Kostner, Leiter des Institutes für Biochemie, Universität Graz, Österreich, 12 mg Lp(a) für in vivo Versuche bezogen werden. Die Qualität der Präparate war im Rahmen der Möglichkeiten des Schneidens der Gehirne am Kyrostaten ausreichend gut, die Hirnstrukturen konnten identifiziert und ausgewertet werden.

4.2 Mikroskopische Auswertung

Die Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung der Färbungen sowie der Immunhistochemie ergaben die Feststellung, daß ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen in der Intensität der intrazerebralen Blutungen in der HE-Färbung erfasst werden konnte. In der Immunhistochemie, durchgeführt um weitere Informationen zum Wirkmechanismus von Lp(a) am Annexin II Rezeptor zu erhalten, sind keine Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar. Die lokale Mehrproduktion von t-PA im Infarktbereich und die schwächere Anfärbung von PAI -1 hebt sich hier hervor, dies war jedoch gruppenunabhängig.

Der ebenfalls gruppenunabhängige Nachweis von t-PA im Hippocampus lässt sich hier als interessanter Nebenfund einordnen, dem in Zukunft auch durch Untersuchungen an hippocampalen Zellen zur t-PA Produktion weiter nachgegangen werden könnte.

Die positiven Ergebnisse dieser Studie könnten in einer erneuten Versuchsreihe mit einer höheren Fallzahl an Tieren oder einer höheren Dosierung von Lp(a) besser herausgearbeitet werden. Die positiven Effekte auf die Blutungen lassen den Schluss zu, daß der Ansatz der hier vorliegenden Arbeit als vielversprechend einzuordnen ist und eine weitere Reihe von Experimenten rechtfertigt.

4.3 Interaktionen von Lp(a) und Annexin II an Endothelzellen und Auswirkungen auf Aktivatoren / Inhibitoren der Fibrinolyse

4.3.1 Lipoprotein(a) und Plasminogen

Lipoprotein(a) ist ein Low-Density-Lipoprotein ähnlicher Partikel, welches mit verschiedenen Erkrankungen, z. B. Atherosklerose oder Myokardinfarkt, in Verbindung gebracht wird. Zusätzlich zum Apolipoprotein B-100 enthält Lp(a) weiterhin, über eine Disulfidbrücke verbunden, das Apolipoprotein(a), welches eine hohe Strukturhomologie mit Plasminogen aufweist (Harpel et al., 1995; Xue et al., 1999)). Es wurde nachgewiesen, daß Apo(a) und Plasminogen auf dem langen Arm von Chromosom 6 liegen und möglicherweise einen gemeinsamen genetischen Ursprung haben (Hajjar et al., 1998; Scanu et al., 1991).

Apo(a) existiert in verschiedenen Isoformen, die definiert sind durch eine variable Anzahl von Plasminogen ähnlichen Kringle IV und einzelnen Kringle V Regionen. Zusätzlich enthält Apo(a) eine katalytische Region (Angles-Cano et al., 2001). Die Kringlesequenz ist wesentlich länger als die des Plasminogens und es existiert eine starke genetische Varianz in ihrer Länge (Durrington et al., 1995; Romics et al., 1990). Wenigstens eine der Plasminogen ähnlichen Kringle IV Regionen des Apo(a), identifiziert als Kringle IV Type 10, enthält eine Lysin Bindungsstelle, die der des Plasminogens entspricht. Diese Struktur erlaubt es diesen Proteinen an Fibrin und Rezeptoren der Zellmembranen zu binden (Angles-Cano et al., 2001; Xue et al., 1999)). Die katalytische Region des Apo(a) unterscheidet sich von der des Plasminogens in der Aminosäuresequenz, weshalb Apo(a) die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin nicht gewährleisten kann. Durch diese strukturelle/funktionelle Ähnlichkeit und enzymatische Differenz kann Lp(a) mit Plasminogen um die Bindungsstellen an Fibrin und Zellmembranen konkurrieren und so die Fibrinolyse inhibieren (Angles-Cano et al., 2001; de la Pena-Diaz et al., 2000; Loscalzo et al., 1990).

Des Weiteren wurde in einer Studie gezeigt, daß Lp(a) in atherosklerotischen Läsionen der Koronararterien und in der Aortenwand kumuliert. Bei transgenen Mäusen, die humanes Apo(a) und apoB -100 exprimieren, wurden schwere atherosklerotische Veränderungen der Arterien nachgewiesen (Fujino et al., 2000; Scanu et al., 1991).

4.3.2 Effekte von Lp(a) auf PAI und t-PA

In den letzten Jahren wurden verschiedene Studien zu Wirkungen von Lp(a) auf t-PA und PAI durchgeführt. Dabei wurde gezeigt, daß Lp(a) die Fibrinolyse auch durch direkte Einflussnahme auf die Plasminogenaktivatoren reguliert (Edelberg et al., 1995). Die Wirkung von Lp(a) auf die Plasmingeneration –bzw. Inhibition ist vor allem abhängig von den in vivo Konzentrationen von Lp(a), PAI und t-PA (Edelberg et al., 1994)

Lp(a) inhibiert die t-PA Sekretion von Endothelzellen um 50% (Levin et al., 1994), und in Gegenwart von Lp(a) ist die Sekretion von PAI -1 erhöht (Harpel et al., 1992; Etingin et al., 1991).

Lp(a) in glycierter Form scheint hier eine noch potentere Rolle zu spielen als nicht-glyciertes Lp(a). Eine Studie zeigte, daß die Spiegel von PAI und PAI mRNA unter glyciertem Lp(a), im Gegensatz zu nativem Lp(a), stark ansteigen, während t-PA reduziert wurde. Der mRNA Spiegel von t-PA blieb jedoch unverändert (Zhang et al., 2000).

Weiterhin wurde die t-PA abhängige Plasmingeneration in Gegenwart von Lp(a) und D-Dimer an Fibrin gemessen. Hierbei zeigte sich, daß in geringen Konzentrationen von t-PA und D-Dimer eine unkompetitive Hemmung durch Lp(a) eintrat. Bei höherer Dosierung jedoch war die Plasminogenbindung an immobilisiertem Fibrin in Gegenwart von Lp(a) um das 2.5fache erhöht (Liu et al., 1993). Dies könnte ein Grund sein, weshalb in den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit die Infarktgrößen in der Lp(a) Gruppe kleiner ausfielen als in der Placebogruppe.

4.3.3 Interaktionen am Annexin II Rezeptor

Der Annexin II Rezeptor gehört zur Familie der Calcium gesteuerten, Phospholipid bindenden Proteine. Er wurde auf einer Reihe von Zellen identifiziert, unter anderem am Endothel und an neoplastischen Zellen sowie Monocyten. Dieser Rezeptor fungiert als ein profibrinolytischer Rezeptor für

Plasminogen und t-PA und katalysiert die Plasmingeneration. Die Überexpression von Annexin II auf leukämischen Zellen und Zellreihen von akuter, promyelozytischer Leukämie korrelierte sowohl mit der klinischen Manifestation von Blutungen als auch mit der in vitro Fähigkeit von leukämischen Zellen Plasmin zu generieren (Kim et al., 2002; Hajjar et al., 2000).

Weiterhin wurden die Bindungsstellen von Plasminogen und t-PA identifiziert. Die Plasminogenbindung erfordert die Kringle assoziierte Lysin Bindungsstelle des Plasminogens die mit dem Rezeptor assoziierten Carboxyl -terminalen Ende interagiert. Diese Bindung wird durch das atherogene Plasminogenanalogon Apolipoprotein(a) inhibiert.

Die t-PA Bindung auf der anderen Seite wird durch die lineare, Fibronectin ähnliche finger-Domäne gewährleistet, die inhibiert werden kann durch Homocystein (Hajjar et al., 1994)

In weiteren kinetischen Untersuchungen des Annexin II Rezeptors konnte gezeigt werden, daß die Plasminogen Aktivierung durch t-PA am Annexin II Rezeptor um das 60fache katalysiert wird (Cesarman et al., 1994). Diese katalytische Eigenschaft ist spezifisch für die t-PA abhängige Plasmingeneration des Annexin II (Zhang et al., 2002).

Durch Inkubation des Rezeptors mit Plasmin kann die katalytische Effizienz und die Plasmingeneration ebenfalls reduziert werden. Annexin II scheint der Schlüsselrezeptor für die endotheliale Plasmingeneration durch t-PA und Plasminogen zu sein (Kang et al., 1999).

Diese Interaktionen von Plasminogen, Lp(a) und t-PA am Annexin II Rezeptor könnten nun einen möglichen Nutzen in der rt-PA Therapie bei Patienten mit akutem, ischämischem Schlaganfall haben. Durch Applikation von rt-PA und Bindung von rt-PA am Annexin II Rezeptor wird die endotheliale Plasminogenaktivierung um das 60fache erhöht, was ursächlich sein könnte für Blutungen die unter der Therapie häufig auftreten. Durch Anbehandlung und Besetzen der Plasminogen Bindungsstelle mit Lp(a) könnte diese endotheliale Aktivierung reduziert werden, da sowohl t-PA als auch Plasminogen am

Annexin II Rezeptor binden müssen um die katalytische Aktivität des Rezeptors zu gewährleisten.

4.4 Einordnung der Ergebnisse in den theoretischen Hintergrund

Die in der Studie erzielten Ergebnisse lassen sich in den theoretischen Hintergrund als vielversprechend einordnen.

Die Frequenz und die Intensität der intrazerebralen Blutungen war in der Lp(a) Gruppe weitaus geringer und weniger intensiv als in der Versuchsgruppe, was einen positiven Effekt von Lp(a) vermuten lässt.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung ergaben keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in den untersuchten Hirnarealen. Daher kann keine eindeutige Aussage über die Bestätigung oder Verwerfung des hier vermuteten theoretischen Wirkmechanismus von Lp(a) am Annexin II Rezeptor und die daraus resultierende Inhibition der endothelialen Plasmingeneration mit konsekutiver Reduktion der Blutungen gemacht werden.

4.4.1 Immunhistochemie

Es kann nicht gesagt werden ob t-PA im Gewebe durch Lp(a) im Sinne einer Reduktion moduliert wird, da sich t-PA nur im Infarktbereich verstärkt und in Gefäßen und Ventrikeln sonst regelmäßig und in beiden Gruppen gleichmäßig darstellte. Dies spricht eher für eine physiologische Mehrproduktion von t-PA im infarzierten Areal. Die Ergebnisse frühere Studien zum Einfluss von Lp(a) auf die t-PA Produktion (Zhang et al., 2000), in der eine Reduzierung von t-PA in Gegenwart von Lp(a) festgestellt wurde (Levin et al., 1994), lässt sich hier nicht bestätigen. Dies könnte durch die therapeutische Applikation von rt-PA im Rahmen der Thrombolyse erklärt werden.

In der PAI-Färbung stellte sich PAI regelmäßig und gruppenunabhängig dar. Es war keine Anfärbung im Gewebe auszumachen, die Färbung beschränkte sich auf die Gefäße und Ventrikel. Auch war kein signifikanter Unterschied zwischen Infarktseite oder Gegenseite erkennbar.

Die gesteigerte Produktion von PAI durch Lp(a) (Harpel et al., 1992; Etingin et al., 1991) ist hier nicht deutlich geworden. Hier könnte ein negativer Feedbackmechanismus durch t-PA und die rt-PA Applikation auf die PAI Produktion ursächlich sein, welcher möglicherweise stärker wirksam ist als der direkte Einfluss von Lp(a) auf PAI.

Die Effekte von Lp(a) auf t-PA und PAI könnten durch eine höhere Dosierung von Lp(a) in einer weiteren Versuchsreihe möglicherweise deutlich gemacht werden. Hier muß beachtet werden, daß diese Arbeit t-PA und PAI im Gewebe untersucht und nicht im Serum.

Die Annexin II Färbung erbrachte keine direkten Informationen über eine Bindung von Lp(a) an den Rezeptor oder eine Verdrängung von Plasminogen aus seiner Bindungsstelle, wie in vorangegangenen Studien beschrieben (Hajjar et al., 1998). Die Nachweismethode in der angewendeten Immunhistochemie beruht auf der Darstellung des Rezeptors, hier bindet der Primärantikörper nicht an der Plasminogenbindungsstelle. Es konnte keine mögliche Beeinflussung des Annexin II Rezeptors durch Lp(a) direkt nachgewiesen werden, da weder Lp(a) noch Plasminogen bestimmt wurden. Annexin II färbte sich bei allen Tieren regelmäßig im Endothel von Gefäßen und Ventrikeln an. Hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen oder der Lokalisation (Infarktseite/Gegenseite) ausgemacht werden. Die theoretische Grundlage, das es sich um einen endothelständigen Rezeptor handelt konnte bestätigt werden, da sich Annexin II bis auf zwei Ausnahmen nur am Endothel von Gefäßen und Ventrikeln darstellte. Bei zwei Tieren konnte eine Anfärbung im Gewebe nachgewiesen werden, was an einen Übertritt des Rezeptors in das Gewebe denken lässt.

4.4.2 BHS-Störungen

In der PAP-Färbung wurden die Störungen der BHS genauer beurteilt und klassifiziert. Hier ergab sich ein Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen. Die Störungen fielen in der Versuchsgruppe wesentlich geringer aus als in der Placebogruppe. Dies lässt sich sowohl auf die Lokalisation als auch auf die Intensität der Störungen beziehen. Vor allem in der gesunden Hemisphäre und im gesunden Gewebe der ischämischen Hemisphäre waren in der Versuchsgruppe keine bzw. nur leichte Störungen festzuhalten. In der Placebogruppe wiesen alle Tiere BHS-Störungen leichten bis schweren Grades auf. Lediglich ein Tier hatte keine Störungen in der gesunden Hemisphäre. Ein positiver Effekt von Lp(a) auf die Abdichtung der BHS und eine Reduzierung der Störungen ist hier also sehr wahrscheinlich.

Dies könnte mit der angenommenen selektiven Beeinflussung der endothelialen Plasmingeneration durch Lp(a) am Annexin II Rezeptor erklärt werden. Durch die Reduzierung der endothelialen Plasmingeneration könnte ein zusätzlicher Schutz des Endothels und der BHS eingetreten sein. Der genaue Wirkmechanismus lässt sich in dieser Studie jedoch nicht näher nachweisen, sollte aber bei weiteren Versuchen genauer untersucht werden.

4.4.3 Lipoprotein(a)-klinische Anwendung

Die Gabe von Lp(a) zu therapeutischen Zwecken kann mit Risiken, z.B. Thrombosebildung, behaftet sein. Da der Metabolismus weitgehend unbekannt ist, kann keine Aussage über mögliche dauerhafte Erhöhungen des Lp(a)-Serumspiegels nach Applikation von Lp(a) getroffen werden. Die prokoagulatorischen Eigenschaften von Lp(a) können negative Konsequenzen haben, wie z.B. Erhöhung des Herzinfarkt- oder Schlaganfallrisikos bei gefährdeten Patienten. Bei einmaliger Anwendung nach einem akuten Schlaganfall ist jedoch nicht mit dauerhaften prokoagulatorischen Effekten zu rechnen.

4.4.4 Weitere Ansätze zur Blutungsreduktion

Ein weiterer Ansatz zur Reduktion intrazerebraler Blutungen nach rt-PA Therapie wird zur Zeit diskutiert. In einer Studie wurde getestet, ob die Inhibition von Metalloproteinasen in Kombination mit rt-PA beim akuten ischämischen Hirninfarkt das Risiko von Blutungen reduziert (Lapchak et al., 2000). In dieser experimentellen Studie wurde gezeigt, daß die Inhibition von Metalloproteinasen in der rt-PA Therapie die intrazerebralen Blutungen senkte. Die Metalloproteinasen sind am Gefäß- und Membranremodelling nach Ischämien beteiligt und in den Mechanismus der rt-PA assoziierten intrazerebralen Blutungen involviert. Der genaue Mechanismus ist wird zur Zeit genauer untersucht. (Sumii et al., 2002; Lapchak et al., 2000). Dies könnte ein weiterer pharmakologischer Ansatz zur Blutungsreduktion in der rt-PA Therapie sein.

5 Zusammenfassung

Die hier vorliegende Arbeit testet die Hypothese, daß das Risiko intrazerebraler Blutungen in der recombinant tissue-Plasminogen Aktivator (rt – PA) Therapie beim akuten ischämischen Schlaganfall durch Applikation von Lipoprotein(a) (Lp (a)) gesenkt werden kann. Weiterhin wurde beurteilt, ob die Infarktgröße unter Lipoprotein(a) zunimmt.

Dies wurde an einem thromboembolischen Schlaganfallmodell an männlichen NMRI-Mäusen untersucht. Der theoretische Hintergrund zu Wirkungen und Interaktionen von Lipoprotein(a) am Annexin II Rezeptor sowie die Verteilung von tissue - Plasminogen Aktivator (t-PA) und Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI) im Gewebe wurde durch ergänzende immunhistochemische Untersuchungen der histologischen Hirnschnitte beurteilt. Die Tiere wurden während der Versuche physiologisch überwacht (art. Blutdruck, Körpertemperatur). Hier wurden die Parameter im Normbereich gehalten und es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen Placebo/Lp(a) festgestellt. Die mikroskopischen Auswertungen ergaben eine Senkung der intrazerebralen Blutungen in der HE-Färbung (Lp(a) 57%; Placebo 100% der Tiere) sowie weniger intensive Störungen der Blut-Hirn-Schranke in der Peroxidase Antiperoxidase (PAP) Färbung (Placebo 100%; Lp(a) 70% der Tiere). Die Infarktgrößen fielen in der Lp(a) Gruppe kleiner aus als in der Placebo Gruppe (Lp(a) $39\% \pm 16\%$; Placebo $48\% \pm 15\%$ der ischämischen Hemisphäre). Die Immunhistochemie zeigte keine Unterschiede in der Verteilung der Proteine (Annexin II, PAI) in den untersuchten Hirnarealen (Infarktkern, gesundes Gewebe der ischämischen Hemisphäre, gesunde Hemisphäre, Gefäße, Ventrikel). Im Infarktbereich war regelmäßig eine stärkere Anfärbung von t-PA festzuhalten, dies war jedoch Gruppenunabhängig und spricht für eine lokale Mehrproduktion von t-PA im Infarktbereich. Ein Benefit durch Lipoprotein(a) hinsichtlich der Frequenz von intrazerebralen Blutungen in der rt – PA Therapie kann hier festgehalten werden. Weitere Versuchsreihen zu dem hier untersuchten Ansatz mit einer höheren Fallzahl an Tieren und einer höheren Dosierung von Lp(a) sind gerechtfertigt.

Literaturverzeichnis

1. (1997): Intrazerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. The NINDS t-PA Stroke Study Group. *Stroke* 28, 2109-18.
2. (1995): Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* 333, 1581-7.
3. Angles-Cano E. (1997): Structural basis for the pathophysiology of lipoprotein (a) in the athero-thrombotic process. *Braz J Med Biol Res* 30, 1271-80.
4. Angles-Cano E, de la Pena Diaz A, Loyau S. (2001): Inhibition of fibrinolysis by lipoprotein (a). *Ann N Y Acad Sci* 936,261-75.
5. Busch E, Kruger K, Hossmann KA. (1997): Improved model of thromboembolic stroke and rt-PA induced reperfusion in the rat. *Brain Res* 778, 16-24.
6. Cesarman GM, Guevara CA, Hajjar KA. (1994): An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator (t-PA). II. Annexin II-mediated enhancement of t-PA-dependent plasminogen activation. *J Biol Chem* 269, 21198-203.
7. Clark WM, Wissman S, Albers GW, Jhamandas JH, Madden KP, Hamilton S.(1999): Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: a randomized controlled trial. Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke. *Jama* 282,2019-26.

8. de la Pena-Diaz A, Izaguirre-Avila R, Angles-Cano E.(2000): Lipoprotein Lp(a) and atherothrombotic disease. Arch Med Res 31,353-9.
9. Durrington PN.(1995): Lipoprotein (a). Baillieres Clin Endocrinol Metab 9,773-95.
10. Edelberg J, Pizzo SV.(1994): Lipoprotein (a) regulates plasmin generation and inhibition. Chem Phys Lipids 67-68,363-8.
11. Edelberg JM, Pizzo SV.(1995): Lipoprotein (a) in the regulation of fibrinolysis. J Atheroscler Thromb 2 Suppl 1,S5-7.
12. Etingin OR, Hajjar DP, Hajjar KA, Harpel PC, Nachman RL.(1991): Lipoprotein (a) regulates plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells. A potential mechanism in thrombogenesis. J Biol Chem 266,2459-65.
13. Fitzpatrick SL, Kassam G, Choi KS, Kang HM, Fogg DK, Waisman DM.(2000): Regulation of plasmin activity by annexin II tetramer. Biochemistry 39,1021-8.
14. Fujino A, Watanabe T, Kunii H, Yamaguchi N, Yoshinari K, Watanabe Y, Mutou M, Ishikawa S, Ogyuu A, Ashikawa K, Maruyama Y.(2000): Lipoprotein(a) is a potential coronary risk factor. Jpn Circ J 64,51-6.
15. Hacke W, Poeck K (2001): Neurologie. 11. Auflage. New York, Berlin, Heidelberg (usw.): Springer Verlag; s. bes. S 228ff.
16. Hacke W, Donnan G, Fieschi C, Kaste M, von Kummer R, Broderick JP, Brott T, Frankel M, Grotta JC, Haley EC, Jr., Kwiatkowski T, Levine SR, Lewandowski C, Lu M, Lyden P, Marler JR, Patel S, Tilley BC, Albers G, Bluhmki E, Wilhelm M, Hamilton S.(2004): Association of outcome with early

stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet* 363,768-74.

17. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Hoxter G, Mahagne MH, et al.(1995): Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *Jama* 274,1017-25.

18. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Davalos A, Meier D, Larrue V, Bluhmki E, Davis S, Donnan G, Schneider D, Diez-Tejedor E, Trouillas P.(1998): Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet* 352,1245-51.

19. Hajjar KA, Acharya SS.(2000): Annexin II and regulation of cell surface fibrinolysis. *Ann N Y Acad Sci* 902,265-71.

20. Hajjar KA, Gavish D, Breslow JL, Nachman RL.(1989): Lipoprotein(a) modulation of endothelial cell surface fibrinolysis and its potential role in atherosclerosis. *Nature* 339,303-5.

21. Hajjar KA, Jacovina AT.(1998): Modulation of annexin II by homocysteine: implications for atherothrombosis. *J Investig Med* 46,364-9.

22. Hajjar KA, Jacovina AT, Chacko J.(1994): An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J Biol Chem* 269,21191-7.

23. Hajjar KA, Krishnan S.(1999): Annexin II: a mediator of the plasmin/plasminogen activator system. *Trends Cardiovasc Med* 9,128-38.

24. Hajjar KA, Mauri L, Jacovina AT, Zhong F, Mirza UA, Padovan JC, Chait BT.(1998): Tissue plasminogen activator binding to the annexin II tail domain. Direct modulation by homocysteine. J Biol Chem 273,9987-93.
25. Hansen PR.(1993): [Lipoprotein(a): a link between thrombosis and atherosclerosis?]. Ugeskr Laeger 155,1527-30.
26. Harpel PC, Borth W.(1992): Identification of mechanisms that may modulate the role of lipoprotein(a) in thrombosis and atherogenesis. Ann Epidemiol 2,413-7.
27. Harpel PC, Hermann A, Zhang X, Ostfeld I, Borth W.(1995): Lipoprotein(a), plasmin modulation, and atherogenesis. Thromb Haemost 74,382-6.
28. Hsu SM, Raine L, Fanger H.(1981): The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. Am J Clin Pathol 75,816-21.
29. Kang HM, Choi KS, Kassam G, Fitzpatrick SL, Kwon M, Waisman DM.(1999): Role of annexin II tetramer in plasminogen activation. Trends Cardiovasc Med 9,92-102.
31. Kim J, Hajjar KA.(2002): Annexin II: a plasminogen-plasminogen activator co-receptor. Front Biosci 7,d341-8.
32. Kostner GM, Ibovnik A, Holzer H, Grillhofer H.(1999): Preparation of a stable fresh frozen primary lipoprotein[a] (Lp[a]) standard. J Lipid Res 40,2255-63.

33. Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA.(2000): Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke* 31,3034-40.
34. Levin EG, Miles LA, Fless GM, Scanu AM, Baynham P, Curtiss LK, Plow EF.(1994): Lipoproteins inhibit the secretion of tissue plasminogen activator from human endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 14,438-42.
35. Liu JN, Harpel PC, Pannell R, Gurewich V.(1993): Lipoprotein(a): a kinetic study of its influence on fibrin-dependent plasminogen activation by prourokinase or tissue plasminogen activator. *Biochemistry* 32,9694-700.
36. Loscalzo J, Weinfeld M, Fless GM, Scanu AM.(1990): Lipoprotein(a), fibrin binding, and plasminogen activation. *Arteriosclerosis* 10,240-5.
37. Marcovina SM, Koschinsky ML.(1998): Lipoprotein(a) as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol* 82,57U-66U; discussion 86U.
38. Miles LA, Fless GM, Levin EG, Scanu AM, Plow EF.(1989): A potential basis for the thrombotic risks associated with lipoprotein(a). *Nature* 339,301-3.
39. Romics L, Karadi I, Csaszar A, Kostner GM.(1990): Physiological and clinical importance of lipoprotein(a). *Tokai J Exp Clin Med* 15,149-54.
40. Rouy D, Koschinsky ML, Fleury V, Chapman J, Angles-Cano E.(1992): Apolipoprotein(a) and plasminogen interactions with fibrin: a study with recombinant apolipoprotein(a) and isolated plasminogen fragments. *Biochemistry* 31,6333-9.
41. Scanu AM.(1992): Lipoprotein(a). Link between structure and pathology. *Ann Epidemiol* 2,407-12.

42. Scanu AM, Lawn RM, Berg K.(1991): Lipoprotein(a) and atherosclerosis. *Ann Intern Med* 115,209-18.
43. Sternberger LA, Hardy PH, Jr., Cuculis JJ, Meyer HG.(1970): The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18,315-33.
44. Sumii T, Lo EH.(2002): Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* 33,831-6.
45. Xue S, Green MA, LoGrasso PV, Boettcher BR, Madison EL, Curtiss LK, Miles LA.(1999): Comparison of the effects of Apo(a) kringle IV-10 and plasminogen kringles on the interactions of lipoprotein(a) with regulatory molecules. *Thromb Haemost* 81,428-35.
46. Zhang J, Ren S, Shen GX.(2000): Glycation amplifies lipoprotein(a)-induced alterations in the generation of fibrinolytic regulators from human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 150,299-308.
47. Zhang X, Zhou H, Shen G, Liu Z, Hu Y, Wei W, Song S.(2002): Study on the mechanism of the annexin II-mediated co-assembly of t-PA and plasminogen. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 22,21-3, 76.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 : Lp(a), Plasminogen und t-PA: Bindung am Annexin II Rezeptor

Abbildung 2 : Operationssitus, Embolisation

Abbildung 3 : Zeitlicher Ablauf der Experimente

Abbildung 4 : Vergleich der Häufigkeit von intrazerebralen Blutungen
Placebo/Lp(a) in Prozent

Abbildung 5 : Vergleich der Infarktgrößen Placebo/Lipoprotein (a) in Prozent
der ischämischen Hemisphäre

Abbildung 6 : BHS-Störungen Placebo/Lp(a)

Abbildung 7 : Intrazerebrale Blutungen HE-Färbung (Anhang)

Abbildung 8 : t-PA Färbung im Gewebe intrazerebral (Anhang)

Abbildung 9 : t-PA Färbung im Hippocampus (Anhang)

Abbildung 10 : PAI Färbung Seitenventrikel (Anhang)

Abbildung 11 : Annexin II Färbung Seitenventrikel (Anhang)

Abbildung 12 : Annexin II Färbung Gewebe (Anhang)

Abbildung 13 : BHS-Störungen PAP-Färbung (Anhang)

Tabellen

Tabelle 1 : Physiologische Parameter vor und nach zerebraler Ischämie

Tabelle 2 : Immunhistochemischer Nachweis von t-PA, PAI und Annexin II
Placebo/Lp(a)

Abbildungsanhang

Abbildung 7: Intrazerebrale Blutungen HE –Färbung

Abbildung 8: T –PA Färbung im Gewebe intrazerebral

Abbildung 9: T –PA Färbung im Hippocampus (rot, Pfeile)

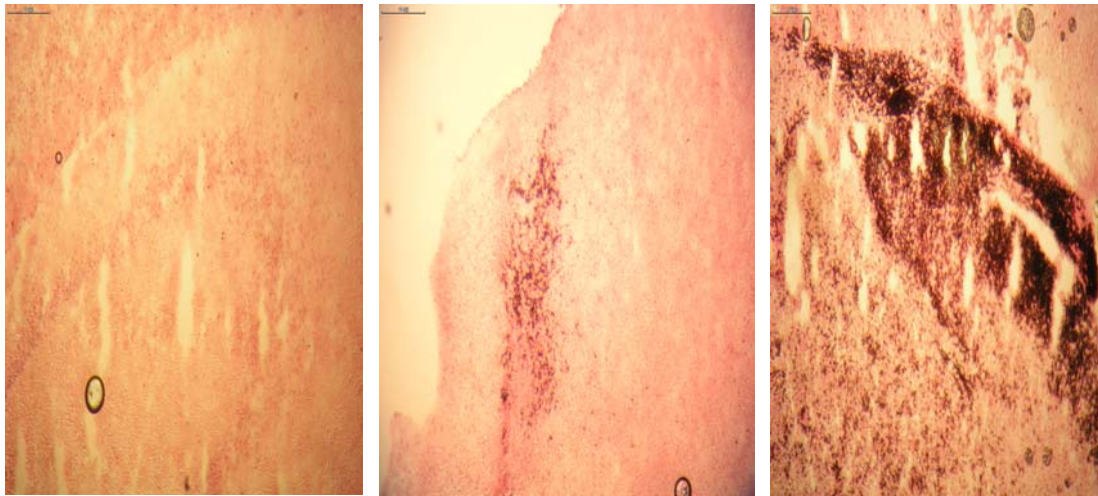
Abbildung 10: PAI Färbung im Seitenventrikel (rot)

Abbildung 11: Annexin II Färbung im Seitenventrikel (rot)

Abbildung 12: Annexin II Färbung im Gewebe (rot)

Abbildung 13: BHS –Störungen in der PAP –Färbung (braun, Pfeil)

Blutungen HE- Färbung



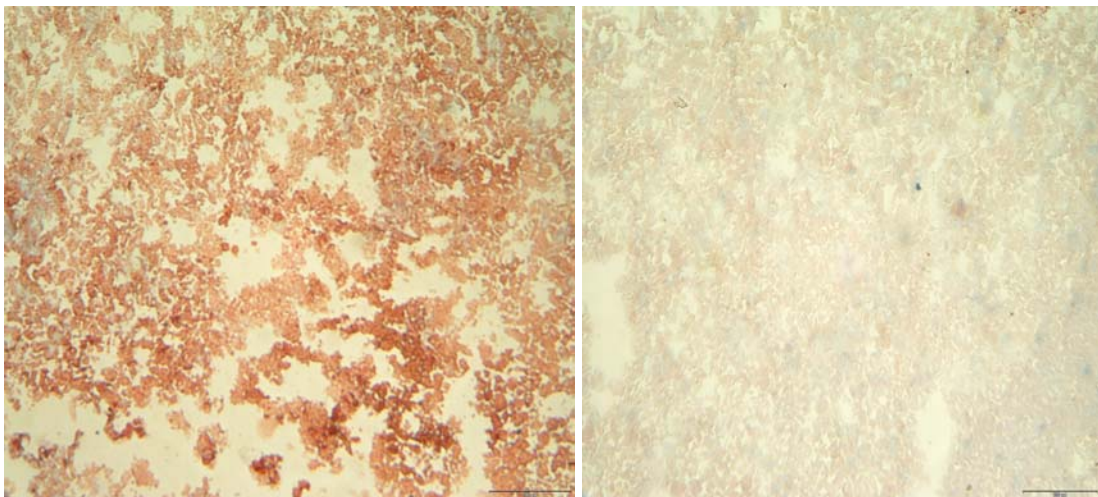
Keine Blutung

Leichte Blutung

Starke Blutung

Abbildung 7: Intrazerebrale Blutungen HE –Färbung

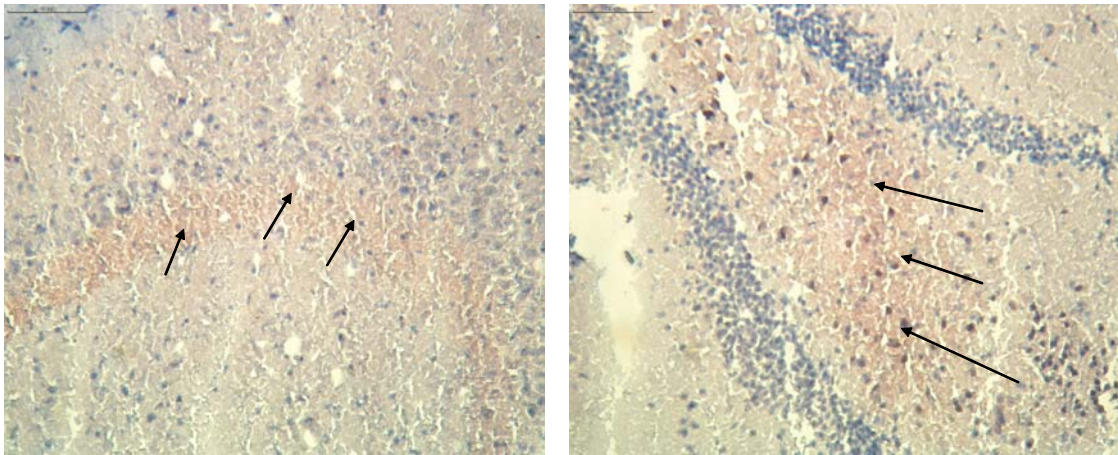
T-Pa



- T-Pa angefärbt im Gewebe
- Links Infarktgebiet, rechts Gegenseite

Abbildung 8: T –PA Färbung im Gewebe intrazerebral

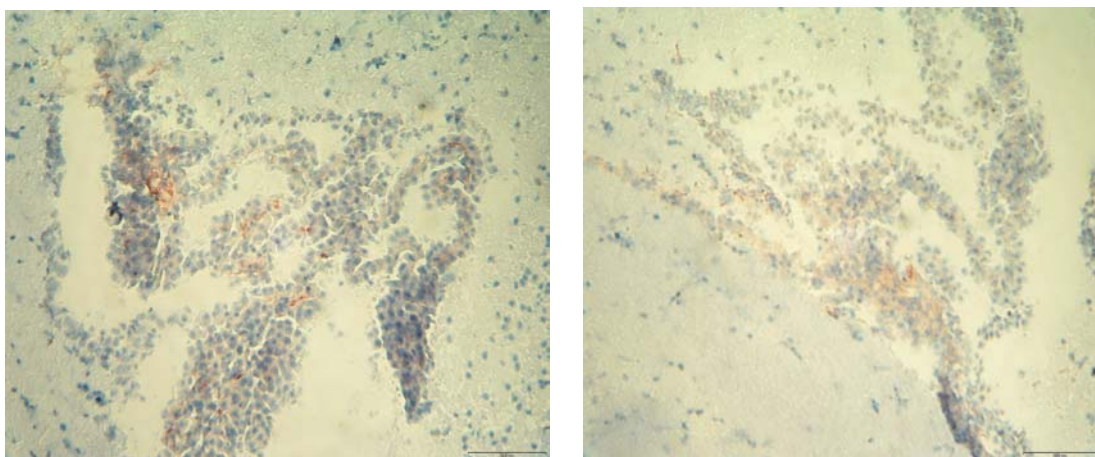
T- Pa Angefärbt im Hippocampus



- T- Pa auf beiden Seiten angefärbt
- Unabhängig von Infarkt

Abbildung 9: T –PA Färbung im Hippocampus (rot, Pfeile)

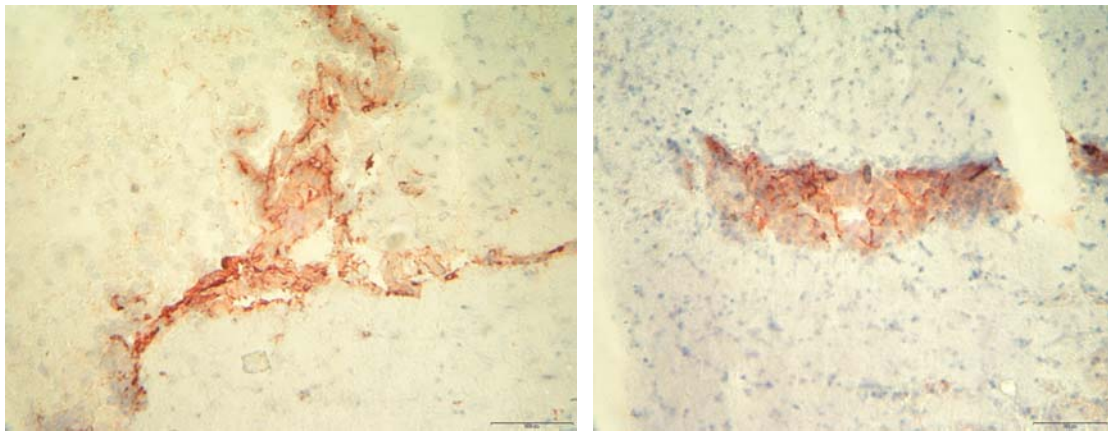
PAI



- PAI angefärbt im Seitenventrikel
- Links Infarktseite, rechts Gegenseite

Abbildung 10: PAI Färbung im Seitenventrikel (rot)

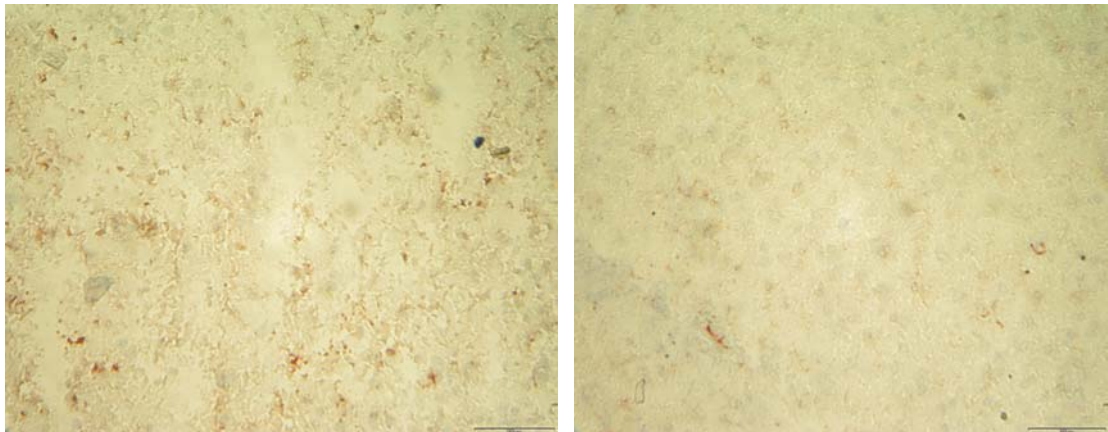
Annexin II



- Annexin II angefärbt im Seitenventrikel
- Links Infarktseite, rechts Gegenseite

Abbildung 11: Annexin II Färbung im Seitenventrikel (rot)

Annexin II



- Annexin II im Gewebe
- Links Infarktseite, rechts Gegenseite

Abbildung12: Annexin II Färbung im Gewebe (rot)

PAP-Färbung

- Nachweis von BHS-Störungen in der PAP-Färbung
- BHS-Störungen bräunlich angefärbt(Pfeil)

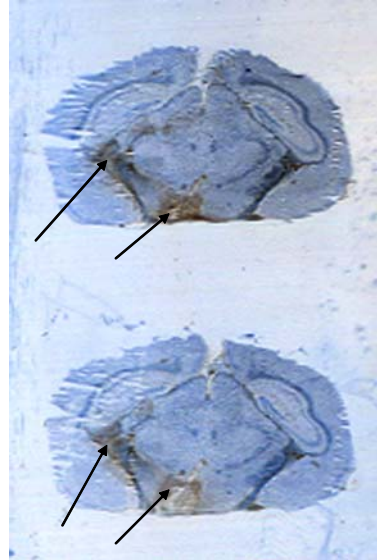


Abbildung 13: BHS-Störungen in PAP-Färbung (braun, Pfeile)

Protokolle der Immunhistochemie

1. t-PA Peroxidase Protokoll

- 1) Schnitte aus -80 °C Gefrierschrank auf T(r) aufwärmen
- 2) Fixation mit 1:1 Aceton/Chloroform
- 3) 10 min. lufttrocknen
- 4) Spülen in PBS-Lösung über 15 min.
- 5) Inkubation in Blotto 20 min.
- 6) Inkubation mit Primärantikörper (Goat anti Human Melanoma t-PA, American Diagnostica Inc., Nr. 387, Lot 980923), Konzentration 1:250 in Reagent Dilution über 2 Stunden bei 37 °C und dann über Nacht bei 4°C im Kühlschrank
- 7) Inkubation mit Sekundärantikörper (Mouse anti Goat IgG, Nr. 205-065-108, Lot. 38727 von Dianova), Konzentration 1:200 in PBS (5µl AK in 1ml PBS, 15µl Horseserum, 1µl Tween 20 (Merck 822184) 10%) über 30 min. bei 37°C
- 8) Spülen in PBS 15 min.
- 9) Blockierung endogener Peroxidasen durch H₂O₂ (10µl 30%iges H₂O₂ in 10 ml PBS) für 20 min
- 10) Spülen in Leitungswasser 3 min.
- 11) Spülen in PBS 15 min.
- 12) Inkubation mit ABC-Komplex (exogene Peroxidase) aus Vectastain-Elite-Kit (PK 6100) in 20µl A + 20µl B in 1ml PBS und 1µl Tween20 10% über 30 min. bei 37°C
- 13) Spülen in PBS 15 min.
- 14) Spülen in Aqua dest.
- 15) Zusatz des Chromogens (AEC: Vector Labs, CAT Nr. SK -4200) in 5 ml Aqua dest. + 2 Tropfen Buffer + 3 Tropfen AEC und 2 Tropfen H₂O₂ über 10 min bei 37° C im Dunkeln

- 16) Spülen in Leitungswasser
- 17) Färben mit Hämalaunlösung (Mayer's), Diagnostica Merck für 45 sec.
- 18) Spülen in Leitungswasser
- 19) Differenzieren mit Bikarbonat
- 20) Spülen in Leitungswasser
- 21) Spülen mit Aqua dest.
- 22) Abtrocknen und Eindeckeln in Glycerin –Gelantine

2. PAI Peroxidase Protokoll

- 1) Schnitte aus -80°C Gefrierschrank auf T(r) aufwärmen
- 2) Fixation mit 1:1 Aceton/Chloroform
- 3) Lufttrocknen
- 4) Spülen in Glycin–PBS (30 mg Glycin auf 40 ml PBS) über 5 min.
- 5) Spülen in PBS über 15 min.
- 6) Inkubation in Blotto bei 4°C im Kühlschrank über 20 min.
- 7) Inkubation im Primärantikörper (Rabbit anti Rat PAI -1 IgG, Lot Nr. 970808, Nr. 1062 American Diagnostica Inc.) in 1:200 Reagent Dilution über 2 Stunden bei 37°C und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank
- 8) Spülen in PBS 30 min.
- 9) Inkubation im Sekundärantikörper (Anti Rabbit IgG biot. aus Vectastain Kit aus Goat (PK 6101) in 1:200 (5 µl AK in 1ml PBS, 15 µl Horseserum, 1µl Tween 20 (Merck 822184) 10% über 30 min. bei 37°C
- 10) Spülen in PBS
- 11) Blockierung endogener Peroxidasen durch H₂O₂ (10 µl 30%iges H₂O₂ in 10 ml PBS) über 20 min.
- 12) Spülen in Leitungswasser über 3 min.
- 13) Spülen in PBS über 15 min.
- 14) Inkubation mit ABC–Komplex (Exogene Peroxidase) aus Vectastain Elite Kit (PK 6100 oder 6101) in 20µl A + 20µl B in 1 ml PBS und 1µl Tween 20 10%
- 15) Spülen in PBS

- 16) Spülen in Aqua dest.
- 17) Zusatz des Chromogens (AEC : Vector Lab, Cat -Nr. SK 4200) in 5 ml Aqua dest + 2 Tropfen Buffer + 3 Tropfen AEC und 2 Tropfen H₂O₂ über 10 min. bei 37°C im Dunkeln
- 18) Spülen in Leitungswasser 3 min.
- 19) Färben mit Hämaunlösung (Mayer's) (Diagnostica Merck) 45 sec.
- 20) Spülen in Leitungswasser
- 21) Differenzieren mit Bikarbonat
- 22) Spülen mit Leitungswasser
- 23) Spülen mit Aqua dest.
- 24) Abtrocknen und Eindeckeln mit Glycerin–Gelatine

3. Annexin II Peroxidase Protokoll

- 1) Schnitte aus -80°C Gefrierschrank auf T(r) aufwärmen
- 2) Fixation mit 1:1 Aceton/Chloroform für 5 min.
- 3) Lufttrocknen
- 4) Spülen in PBS 3mal 5min.
- 5) Inkubation in Blotto für 20 min.
- 6) Ränder trockenwischen
- 7) Inkubation im Primärantikörper (ICN Biomedicals, Monoclonal Anti–Annexin II Isotype IgG 1, Lot Nr. 6713F), 1:100 in Reagent Dilution für 2 Stunden bei 37°C und dann über Nacht bei 4°C
- 8) Spülen in PBS 3mal 10 min.
- 9) Ränder trockenwischen
- 10) Inkubation im Sekundärantikörper (Anti Rabbit IgG biot. aus Vectastain Kit aus Goat (PK Nr. 6101), 1:200 in PBS (5µl AK in 1ml PBS, 15µl Horseserum, 1µl Tween 20 (Merck 822184) 10% für 30 min. bei 37°C
- 11) Spülen in PBS
- 12) Blockierung endogener Peroxidasen durch H₂O₂ (10µl 30%iges H₂O₂ in 10ml PBS für 20 min.
- 13) Spülen in Leitungswasser

- 14) Spülen in PBS 3 min.
- 15) Ränder trockenwischen
- 16) Inkubation mit ABC-Komplex (Exogene Peroxidase) aus Vectastain Elite Kit (PK 6100), (20µl A + 20µl B in 1ml PBS und 1µl Tween20 10%) für 30 min. bei 37°C
- 17) Spülen in PBS 3mal 5min.
- 18) Spülen in Aqua dest.
- 19) Zusatz des Chromogens (AEC: Vector Lab, Cat.-Nr. SK -4200) (5 ml Aqua dest. + 2 Tropfen Buffer + 3 Tropfen AEC und 2 Tropfen H₂O₂) für 10 min. bei 37°C im Dunkeln
- 20) Spülen in Leitungswasser 3 min.
- 21) Färben mit Hämaunlösung (Mayer's, Diagnostica Merck) 45 sec.
- 22) Spülen in Leitungswasser
- 23) Differenzieren mit Bikarbonat
- 24) Spülen in Leitungswasser 3 min.
- 25) Spülen mit Aqua dest.
- 26) Abtrocknen
- 27) Eindeckeln mit Glycerin-Gelatine

4. Peroxidase-Anti-Peroxidase Protokoll (PAP)

- 1) Schnitte aus -80°C Gefrierschrank auf T(r) aufwärmen
- 2) Kurz mit PBS waschen
- 3) 30 min. in 4,5 % Formalin ansetzen
- 4) Kurz mit PBS waschen
- 5) 30 min. mit Wasserstoffperoxid / Methanol (MeOH) ansetzen (3ml 30%iges Wasserstoffperoxid auf 300 ml MeOH)
- 6) Kurz mit PBS waschen
- 7) Schnitte in Inkubationskammer sortieren und mit PBS überschichten
- 8) 1 ml Normal Swine Serum (DAKO, Normal Swine Serum, Code Nr. X0901) 1: 500 mit PBS/BSA (40µl / 20 ml) für 1 Stunde inkubieren
- 9) Dekantieren, 2mal 5 min. mit PBS waschen

- 10) 1 ml Mouse Immunglobulins (DAKO Code Nr. Z 0456) 1: 500 mit PBS/BSA (40µl / 20 ml) inkubieren (= Primärantikörper) über Nacht bei 4 °C
- 11) 3 mal 5 min. mit PBS waschen
- 12) 1 ml Swine anti Rabbit/ Mouse/ Goat Immunglobulinlsg. (DAKO Lot. Nr. 6506) 1:50 mit PBS/BSA (400µl / 20 ml) 30 min. bei T(r) inkubieren
- 13) 3 mal 5 min. mit PBS waschen
- 14) 1 ml Rabbit PAP Lsg. (DAKO PAP, Rabbit, Code Nr. Z0113) 1 : 200 mit PBS/BSA (100 µl / 20 ml) = PAP-Komplex für 30 min. bei T(r) Inkubieren
- 15) 3 mal 5 min. mit PBS waschen
- 16) DAB/Wasserstoffperoxidlsg. (Vector Labs, Peroxidase Substrate Kit DAB, SK-4100) ansetzen für 3-6 min.
- 17) 4 -5 mal mit PBS waschen
- 18) Schnitte in Küvettenrack überführen, 3mal kurz mit PBS waschen
- 19) Spülen mit Leitungswasser
- 20) Färben mit Hämalaunlösung (Mayer's, Diagnostica Merck) für 45 sec.
- 21) Spülen in Leitungswasser
- 22) Differenzieren mit Bikarbonat
- 23) Spülen in Leitungswasser für 3 min.
- 24) Spülen mit Aqua dest.
- 25) Abtrocknen
- 26) Eindeckeln mit Glycerin-Gelatine

Abkürzungsverzeichnis

A.	: Arteria
Abb.	: Abbildung
ABC	: Avidin–Biotin–Complex
ACC	: Arteria carotis communis
ACE	: Arteria carotis externa
ACI	: Arteria carotis interna
ACM	: Arteria cerebri media
AK	: Antikörper
Apo(a)	: Apolipoprotein(a)
apoB-100	: Apolipoprotein B -100
Aqua dest.	: Destiliertes Wasser
BHS	: Blut–Hirn–Schranke
BSA	: Bovine Serum Albumin
cm	: Zentimeter
°C	: Grad Celsius
DAB	: 3,3'- diaminobenzidine
dl	: Deziliter
g	: Gramm
GLU	: Glutamin
h	: Stunde
HE	: Hämatoxylin–Eosin
i.a.	: intraarteriell
i.v.	: intravenös
IZB	: Intrazerebrale Blutung
Kg	: Kilogramm
LDL	: Low–Density–Lipoprotein
Lp(a)	: Lipoprotein(a)
LYS	: Lysin
µl	: Mikroliter

m	: Meter
mg	: Milligramm
mg/dl	: Milligramm pro Deziliter
mg/Kg/KG	: Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
mg/ml	: Milligramm pro Milliliter
min	: Minute
ml	: Milliliter
ml/h	: Milliliter pro Stunde
mm	: Millimeter
Na	: Natrium
NaCl	: Natriumchlorid
PAI	: Plasminogen–Aktivator–Inhibitor
PAP	: Peroxidase–Antiperoxidase
PBS	: Phosphate Buffered Saline
Plg	: Plasminogen
rt –PA	: recombinant tissue–plasminogen–activator
sec	: Sekunde
st	: Stunde
t –PA	: tissue–plasminogen–activator
V.	: Vena
Vol%	: Volumenprozent
z. B.	: zum Beispiel

Danksagung

Meinem Betreuer Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Elmar Busch, Frau Dipl.-Biol. Sonja Kreischer für Einarbeitung und Hilfe im Labor, Herrn Prof. Dr. med. Gerhard Kostner für die Bereitstellung des Lipoprotein(a), sowie den anderen Doktoranden und natürlich meinen Eltern.

Lebenslauf

Persönliche Daten: Alexander Malin, wohnhaft in Bochum

Geburtsdatum: 22.03.1976

Geburtsort: Berlin

Konfession: ev.

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1982-85: Grundschule Grimselweg, Hannover

1985-87: OS Luerstraße, Hannover

1987-89: Kaiser-Wilhelm-Gymnasium, Hannover

ab 1989: Gymnasium am Ostring, Bochum

1995: Abitur

Zivildienst:

1995-96: Arbeiter-Samariter-Bund, OV Bochum

Ausbildung zum Rettungssanitäter 1995

Studium und Praktika:

1996-99: Studium an der Ruhr-Universität Bochum (5 Semester)

Frühjahr 1999: Ärztliche Vorprüfung

1999-2003: Studium an der Universität Duisburg-Essen (9 Semester)

November 2003: 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr:

Innere Medizin am St. Josef Hospital Oberhausen

Chirurgie am St. Josef Hospital Oberhausen

Anästhesie am St. Josef Hospital Oberhausen

Auslandsstudium:

2000-01: Studium an der Universidad Miguel-Hernandez de Elche, Alicante, Spanien (ERASMUS-Program) (2 Semester)

01.07.2004 – 30.09.2005: Assistenzarzt am Knappschafts Krankenhaus Bochum-Langendreer, Universitätsklinik Bochum, Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie (Direktor: Prof. Dr. med. M. Zenz)

Seit 01.10.2005 : Assistenzarzt am Marienhospital Gelsenkirchen, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Duisburg – Essen, Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie (Kom. Leitung durch Dr. Cakir, Dr. Rupprecht, E. Stein)